

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE SURFACTANTE
POR *Serratia marcescens*

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre
em Ciência de Alimentos**

Cristina Ferraz Silva
Química Industrial

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cristina Ferraz Silva**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de julho de 2002.

Campinas, 19 de julho de 2002.



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

UNICAMP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BB
CHAMADA T/UNICAMP
Si 38p
EX
OMBO BC/ 50295
ROC 16-837/02
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA 13/08/02
CPD

CM00171934-1

B ID 250725

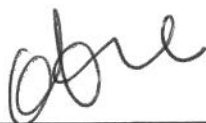
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Silva Ferraz, Cristina
~~FA18p~~ Produção biotecnológica de surfactante por *Serratia*
Si 38p *marcescens* / Cristina Ferraz. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biosurfactantes. 2.*Serratia marcescens*. 3.Fermentação.
I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gláucia M. Pastore
(orientadora)



Profa. Hilary C. de Menezes
(membro)

Prof. Dr. Yong K. Park
(membro)



Prof. Dr. Severino M. de Alencar
(membro)

**ESTA TESE É DEDICADA A MINHA MÃE
MARA BRIGIDA FERRAZ,
UMA PESSOA CORAJOSA QUE ME INCENTIVOU E
ACREDITOU EM MIM EM TODOS OS MOMENTOS.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Gláucia Pastore pela oportunidade de realização deste trabalho,
Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada e pelo valioso auxílio na elaboração final desta dissertação,
À técnica do laboratório de microbiologia, Rosa Maria Tosello, pela ajuda a qual foi essencial em várias etapas,
Aos colegas do laboratório de bioquímica de alimentos por toda amizade, apoio e ajuda na realização deste trabalho,
Aos amigos Maria Beatriz, Edson Davi, Eliane, Guilherme, Jardete Thomaz, Macos Sampaio e Marcos Castro pelo carinho e amizade,
Em especial agradeço à Hermelinda pelo carinho dedicado e pelas sábias palavras durante os momentos mais difíceis,
Ao Marcelo de O. Khnayfes pela amizade e dedicação durante a realização deste trabalho,
Aos amigos Márcia Nitschke e Álvaro A. de Araújo pela grande amizade e pela contribuição na realização desta dissertação,
Ao meu colega e amigo Severino M. de Alencar pela sua dedicação e ajuda a todos os colegas do laboratório de bioquímica de alimentos,
A amiga Gabriela Koblitz pela colaboração na etapa final desta dissertação e também agradeço a ela e ao Flávio pela grande amizade.
Aos amigos Mareci Mendes, Maria Eugênia, Luciana Ferracini, Margariada Yamaguchi, Gisele, Luciana Fleury, Ana Maria, Luciana Liboni, Julio Paredes e Cláudio Aguiar pelo coleguismo e cooperação durante todos os momentos,
Agradeço aos meus familiares e em particular ao meu irmão Carlos Eduardo Ferraz Silva, a minha mãe Mara Brigida Ferraz e ao meu pai Luiz Carlos Barbosa Silva por todo apoio durante a minha caminhada,
Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Diz o mestre:

A Lenda Pessoal não é tão simples como parece. Pelo contrário, pode ser uma atividade perigosa. Quando queremos algo, colocamos em marcha energias poderosas, e já não podemos esconder de nós mesmos o verdadeiro sentido da nossa vida.

Quando queremos algo, fazemos uma escolha do preço a pagar.

Seguir um sonho tem um preço. Pode exigir que abandonemos velhos hábitos, pode nos fazer passar dificuldades, ter decepções, etc.

Mas, por mais alto que seja este preço, nunca é tão alto como o que é pago por quem não viveu sua Lenda Pessoal. Porque estes um dia vão olhar para trás, ver tudo o que fizeram, e escutar o próprio coração dizer: “Desperdicei minha vida”.

Acreditem, esta é uma das piores frases que alguém pode ouvir.

Paulo Coelho.

ÍNDICE:

Resumo	7
Summary	8
1. Introdução	9
2. Objetivos	10
3. Revisão Bibliográfica	11
3.1 Introdução	11
3.2 Classificação química dos biosurfactantes e sua origem microbiana	12
3.3 Propriedades e funções fisiológicas dos biosurfactantes	15
3.3.1 Propriedades	15
3.3.2 Função fisiológica dos biosurfactantes	19
3.4 Seleção de microrganismos produtores de biosurfactante	20
3.5 Produção e recuperação	21
3.5.1 Produção	21
3.5.2 Recuperação	24
3.6 Aplicações industriais	25
3.7 Serrawetina	28
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Produção de biosurfactante	30
4.2 Determinação da Tensão Superficial	30
4.3 Determinação da Concentração Micelar Diluída (CMD)	31
4.4 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	31
4.5 Identificação do microrganismo produtor	32
4.5.1 Características morfológicas	32
4.5.1.1 Morfologia macroscópica das colônias	32
4.5.2 Características microscópicas	33
4.5.3 Características fisiológicas	33
4.5.3.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento	33
4.5.3.2 Requerimento de oxigênio	33

4.5.3.3 Teste de osmotolerância – requerimento de NaCl	34
4.5.4 Características bioquímicas	34
4.5.4.1 Hidrólise do amido	34
4.5.4.2 Hidrólise da gelatina	34
4.5.4.3 Teste da produção da enzima catalase	35
4.5.4.4 Teste da produção da enzima citocromo oxidase	35
4.5.4.5 Prova do indol	35
4.5.4.6 Utilização de citrato	35
4.5.4.7 Prova de Voges-Proskauer	35
4.5.4.8 Prova da urease	35
4.6 Curva de crescimento e padronização do inóculo	36
4.7 Seleção do meio de produção	36
4.8 Otimização da produção de biosurfactante por <i>S. marcescens</i> LB006	36
4.8.1 Determinação da temperatura ótima em ensaio univariável	37
4.8.2 Determinação do pH ótimo em ensaio univariável	38
4.8.3 Planejamento fatorial e “screening design”	38
4.8.4 Planejamento fatorial fracionário	39
4.8.5 Planejamento fatorial completo	40
4.9 Curva de produção de biosurfactante x tempo de fermentação	41
4.10 Influência da adição de óleos vegetais na produção de biosurfactante	42
4.11 Influência da adição de petróleo e hidrocarbonetos na produção de biosurfactante	42
4.12 Produção de biosurfactante em resíduos provenientes da indústria de alimentos	42
4.13 Determinação da atividade emulsificante	43
4.14 Determinação da estabilidade térmica do biosurfactante produzido	43
4.15 Efeito do pH na estabilidade do biosurfactante produzido	43
4.16 Recuperação do biosurfactante	43
4.17 Aplicação do biosurfactante produzido	44
4.17.1 Influência da adição do biosurfactante na atividade de lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	44
4.17.2 Determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante	44
4.17.3 Influência da adição de surfactantes químicos na atividade da lipase	45

5. Resultados e discussão	46
6. Conclusões	80
7. Referências bibliográficas	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de biosurfactantes e microrganismos produtores	15
Tabela 2: Tensão superficial de alguns biosurfactantes específicos	18
Tabela 3: Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes	28
Tabela 4: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e pontos centrais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006	39
Tabela 5: Níveis das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e pontos centrais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006	40
Tabela 6: Planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006	41
Tabela 7: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006	41
Tabela 8: Planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para determinação da melhor concentração de enzima e de biosurfactante	45
Tabela 9: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para determinação da melhor concentração de enzima e de biosurfactante	45
Tabela 10: Produção de biosurfactante em Meio Base	47
Tabela 11: Características bioquímicas	49
Tabela 12: Resultados de tensão superficial da linhagem LB006 em diferentes meios de produção	52
Tabela 13: Resultados de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} da linhagem LB006 em diferentes meios de produção	55
Tabela 14: Determinação da temperatura ótima para produção de biosurfactante	55
Tabela 15: Determinação do pH ótimo para produção de biosurfactante	56
Tabela 16: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 24 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais	57
Tabela 17: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 48 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais	58
Tabela 18: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 72 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais	59

Tabela 19: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006	60
Tabela 20: Efeitos das variáveis do planejamento fatorial fracionário para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006	60
Tabela 21: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 48 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais	61
Tabela 22: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 72 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais	62
Tabela 23: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 96 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais	62
Tabela 24: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006	63
Tabela 25: Efeitos das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2	64
Tabela 26: Coeficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2^2	64
Tabela 27: Análise de variância do planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006	65
Tabela 28: Influência de óleos vegetais na produção de biosurfactante	70
Tabela 29: Influência da adição de petróleo e hidrocarbonetos na produção de biosurfactante	71
Tabela 30: Produção de biosurfactante por <i>S. marcescens</i> em resíduos industriais	72
Tabela 31: Efeito do pH na estabilidade do biosurfactante produzido	73
Tabela 32: Influência da temperatura na estabilidade do biosurfactante produzido	73
Tabela 33: Influência da adição do biosurfactante na hidrólise de diferentes substratos pela enzima lipase	74
Tabela 34: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para a determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante	75
Tabela 35: Efeitos das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 para a determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante	76
Tabela 36: Coeficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2^2 para a determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante	76
Tabela 37: Análise de variância do planejamento fatorial completo 2^2 para a determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ramnolípídeo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Figura 02: Estrutura do lipopeptídeo cíclico - surfactina	13
Figura 03: Estrutura da fosfatidiletanolamina	14
Figura 04: Emulsan	14
Figura 05: Força de atração de moléculas de um líquido	16
Figura 06: Adsorção de moléculas tensoativas	17
Figura 07: Estrutura molecular do biosurfactante produzido por <i>S. marcescens</i>	29
Figura 08: Método por a determinação da CMC	32
Figura 09: Morfologia das colônias do isolado LB006	48
Figura 10: Morfologia das colônias do isolado LB006 ampliada	48
Figura 11: Características microscópicas do isolado LB006	49
Figura 12: Microscopia eletrônica do isolado LB006 pelo método de varredura	50
Figura 13: Kit API 20E	53
Figura 14: Curva de crescimento de <i>S. marcescens</i> LB006	54
Figura 15: Superfície de resposta	65
Figura 16: Superfície de contorno	66
Figura 17: Cinética de produção de biosurfactante	68
Figura 18: Índice de emulsificação	68
Figura 19: Atividade emulsificante do biosurfactante bruto	69
Figura 20: Superfície de resposta	77
Figura 21: Superfície de contorno	77
Figura 22: Influência da adição de biosurfactante na hidrólise de gordura de coco e gordura de frango pela enzima lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	78
Figura 23: Influência da adição de surfactantes na atividade da enzima lipase	79

RESUMO

Biosurfactantes são compostos produzidos por microrganismos os quais possuem em sua molécula uma porção hidrofílica (solúvel em água) e uma porção hidrofóbica (insolúvel em água). Essas moléculas são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial em ambas soluções aquosas e misturas de hidrocarbonetos, as quais fazem desses compostos potenciais candidatos para aumentar a recuperação de óleo e processos de deemulsificação.

No presente trabalho foi estudada a produção de biosurfactante por uma linhagem de bactéria. O microrganismo considerado foi pré-selecionado como produtor de biosurfactante em trabalhos anteriores e identificado nesta dissertação como *Serratia marcescens*. As melhores condições para produção do biosurfactante em agitador rotativo foram determinadas através do processo de otimização utilizando Planejamento Experimental. Além disso, foram estudadas algumas propriedades do biosurfactante, como por exemplo, capacidade emulsificante e estabilidade em diferentes pHs e temperaturas. Finalmente, testou-se a aplicação do biosurfactante produzido avaliando-se o efeito da sua adição na atividade de lipase de *Rhizopus* sp. quando comparado ao efeito produzido por surfactantes químicos.

SUMMARY

Biosurfactants are compounds produced by microorganisms those molecules include a hydrophilic portion (water soluble) and a hydrophobic portion (water insoluble). These molecules are capable of reducing surface and interfacial tensions in both aqueous solutions and hydrocarbon mixtures, which makes them potential candidates for enhancing oil recovery and deemulsification processes.

Biosurfactant production by a bacterial strain was studied in this work. The microorganism considered was isolated in previous studies and identified in this work as *Serratia marcescens*. The best conditions for biosurfactant production in shake flasks were determined through an optimization process using an Experimental Design. Moreover, some properties of the biosurfactant were studied, for example, its emulsifying capacity and stability at different pH values and temperatures. Finally, the application of the biosurfactant produced was tested evaluating the effect of its addition on the activity of *Rhizopus* sp. Lipase, as compared to the effect produced by chemical surfactants.

1. INTRODUÇÃO:

Recentes avanços da biotecnologia na última década têm levado a um crescimento significativo no desenvolvimento de métodos biológicos para a produção de certos compostos em escala industrial.

Um grupo de compostos de extremo interesse industrial e com múltiplas aplicações são os biosurfactantes, cuja estrutura possui um grupo polar hidrofílico, capaz de se ligar com a água e um apolar hidrofóbico, capaz de se ligar com compostos insolúveis em água, como óleos e gorduras. Dependendo da composição e do balanço de cargas entre os grupamentos hidrofílico e hidrofóbico, os biosurfactantes podem ser divididos em: glicolipídeos, lipopolissacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros.

Quanto as suas propriedades físicas, os biosurfactantes apresentam a capacidade de diminuir a tensão superficial do meio em que se encontram, bem como de diminuir a tensão interfacial entre dois meios imiscíveis. Outra propriedade importante desses compostos é a capacidade de formação de micelas em solução, onde moléculas de surfactante tendem a se agregar umas com as outras ou entre fases com diferentes polaridades, como óleo e água.

Os biosurfactantes possuem inúmeras aplicações nos mais diversos segmentos industriais, podendo ser utilizados como emulsificantes, estabilizadores de emulsão, detergentes, solubilizantes de sólidos dispersos, inibidores de corrosão além de apresentarem vantagens sobre os sintetizados quimicamente, pois são biodegradáveis, mais efetivos, específicos e usualmente não tóxicos.

Na indústria de alimentos os biosurfactantes têm grande aplicação, já que esta é considerada uma das grandes consumidoras de emulsificantes. Eles podem ser utilizados nas indústrias de panificação, as quais empregam emulsificantes com o objetivo de aumentar a aderência do amido à proteína, controlando a consistência e textura do produto final e retardando o seu envelhecimento. Ainda na mesma linha, os biosurfactantes podem ser utilizados para solubilizar “flavors” oleosos. Os biosurfactantes podem ainda atuar na limpeza de plantas de indústrias alimentícias, removendo resíduos oleosos resultantes dos processos de fabricação. Esses compostos também possuem aplicação em derivados cárneos, atuando tanto na limpeza de plantas industriais como no melhoramento da textura de produtos emulsionados. Nesse caso, os biosurfactantes podem agir no aumento da interação entre as proteínas da

carne, melhorando a textura do produto e ajudando na formação da emulsão, como por exemplo, na produção de salsichas. No entanto, o uso promissor desses compostos tem sido na área de biorremediação e recuperação terciária de petróleo. Além disso, recentemente muitos estudos têm sugerido o uso de surfactantes no aumento da atividade de enzimas lipase, tanto em reações de hidrólise como de síntese.

Quanto à sua produção, os biosurfactantes podem ser produzidos por diferentes classes de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, todos com propriedades e aplicações bastante diversas.

No entanto, a produção de biosurfactantes passa por alguns problemas como a baixa concentração de produto final obtida no meio de fermentação, raramente excedendo a 10 g/L. A seleção de microrganismos e a otimização das condições de produção, como o realizado neste trabalho, tem contribuído para o incremento substancial na produção desses compostos.

2. OBJETIVOS

- Selecionar o microrganismo de maior interesse na produção de biosurfactante, dentre os previamente isolados e selecionados como produtores de surfactante pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos.
- Identificar o gênero e a espécie do microrganismo selecionado.
- Selecionar o meio de cultura e otimizar as melhores condições de produção do biosurfactante utilizando o Planejamento Experimental.
- Verificar a influência de hidrocarbonetos e óleos vegetais na produção do biosurfactante.
- Verificar a capacidade do microrganismo selecionado em produzir biosurfactante em resíduos provenientes da indústria de alimentos.
- Estudar a atividade emulsificante do biosurfactante produzido.
- Verificar a influência do biosurfactante produzido na atividade da enzima lipase produzida por *Rhizopus* sp.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Introdução

Surfactantes são moléculas constituídas por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Estes compostos são classificados como catiônicos, aniônicos ou não iônicos de acordo com sua parte hidrofílica, enquanto que a parte hidrofóbica é geralmente constituída por um hidrocarboneto derivado de um ácido graxo. Devido a sua natureza anfipática, apresentam a capacidade de se dividirem na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, tais como óleo e água ou ar e água (Desai e Banat, 1997; Mulligan e Gibbs, 1993). Essas propriedades conferem aos surfactantes a capacidade de reduzir as tensões interfacial e superficial do meio em que se encontram, formando microemulsões nas quais há a formação de micelas. Isto possibilita que hidrocarbonetos sejam solubilizados em água ou água seja solubilizada em hidrocarbonetos. Tais características conferem aos surfactantes excelente detergência, capacidade emulsificante, espumante e dispersante de fases, o que faz desses compostos um dos produtos químicos mais versáteis (Greek, 1990; Greek, 1991). A maior parte dos surfactantes usados atualmente é quimicamente derivada de petróleo. Entretanto, o interesse na obtenção de surfactantes de origem microbiana tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido a sua diversidade, biodegradabilidade, possibilidade de produção por meio fermentativo e sua potencial aplicação tanto no processamento de alimentos como na biorremediação, como por exemplo, na recuperação de óleo bruto. (Desai e Banat, 1997).

Biosurfactantes são um grupo estruturalmente diverso de moléculas com atividade surfactante sintetizadas por microrganismos. Esses apresentam as mesmas propriedades dos surfactantes químicos de reduzir as tensões superficial e interfacial em ambas soluções aquosas e misturas de hidrocarbonetos; devido a isso, podem ser usados no aumento da recuperação de óleo (Sarkar *et al.*, 1989; Shennan e Levi, 1987; Singer, 1985) e processos de deemulsificação (Carins *et al.*, 1982).

Os biosurfactantes oferecerem algumas vantagens sobre os surfactantes químicos, tais como baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, elevada seletividade e especificidade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, sendo ecologicamente aceitáveis e podendo ser produzidos de forma renovável (por microrganismos) (Makkar e Cameotra, 1999).

3.2 Classificação química dos Biosurfactantes e sua origem microbiana

Os biosurfactantes são classificados principalmente pela sua composição química e origem microbiana, diferente dos surfactantes sintetizados quimicamente, os quais são agrupados de acordo com a natureza do seu grupo polar. Em geral, os biosurfactantes incluem em sua estrutura molecular uma parte hidrofílica a qual pode ser constituída de aminoácidos ou peptídeos aniônicos ou catiônicos; mono, di ou polissacarídeos; e uma parte hidrofóbica constituída de uma cadeia hidrocarbônica insaturada, saturada ou derivada de um ácido graxo. De acordo com a composição de ambas as partes, os biosurfactantes podem ser classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, etc. (Desai e Banat, 1997). Microrganismos também podem produzir surfactantes que são, geralmente, uma combinação de muitos tipos químicos, os quais são referidos como biosurfactantes poliméricos. No entanto, há alguns casos onde a célula microbiana intacta apresenta elevada hidrofobicidade superficial, sendo a célula o próprio biosurfactante, e esses são classificados como biosurfactantes particulados (Karanth *et al.*, 1999).

Na Tabela 1, estão apresentados os tipos mais comuns de biosurfactantes produzidos e sua respectiva origem microbiana.

- Glicolipídeos:

Os glicolipídeos são os biosurfactantes mais conhecidos até o momento. Sua estrutura molecular é constituída por ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos em combinação com mono, di, tri ou tetrassacarídeos que incluem glicose, manose, galactose, ácido glucurônico, ramnose e sulfato galactose. Os ramnolipídeos possuem em sua fórmula estrutural uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido hidroxidecanóico, e esses são os glicolipídeos mais estudados (Desai e Desai, 1993). A produção de glicolipídeos contendo ramnose (Figura 1) foi primeiramente descrita através de estudos realizados por Jarvis e Johnson (1949), usando linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos já demonstraram uma elevada capacidade desses compostos em emulsionar alcanos, estimulando o desenvolvimento de *P. aeruginosa* em hexadecano (Herdegger *et al.*, 1994).

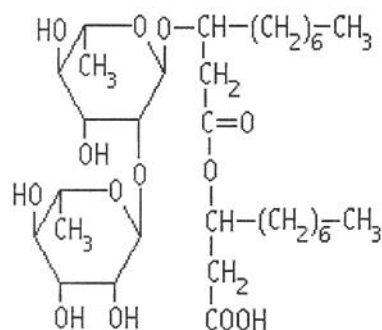


Figura 1: Rhamnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa*

- Lipopeptídeos e Lipoproteínas:

Grande número de lipopeptídeos cíclicos apresentam atividade surfactante, tais como antibióticos decapeptídeos (gramicidinas) e antibióticos lipopeptídeos (polimixinas), os quais são produzidos por *Bacillus brevis* (Marahiel *et al.*, 1977) e *B. polymyxa* (Suzuki *et al.*, 1965), respectivamente. Um biosurfactante aminolipídico produzido por *Serratia marcescens* NS38, chamado serratamolide, foi primeiramente isolado por Matsuyama *et al.* (1985), demonstrando que esse composto foi capaz de aumentar a hidrofobicidade da célula, bloqueando os sítios hidrofílicos na superfície celular. A surfactina, um lipopeptídeo cíclico (Figura 2) produzido por *B. subtilis* ATCC 21332, é um dos biosurfactantes mais estudados, devido a sua capacidade de baixar a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m quando presente em baixas concentrações (Arima *et al.*, 1968).

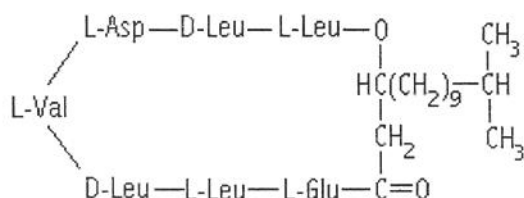


Figura 2: Estrutura do lipopeptídeo cíclico surfactina produzido por *Bacillus subtilis*

- Ácidos graxos, Fosfolipídeos e Lipídeos neutros:

Algumas bactérias e leveduras produzem grande quantidade de ácidos graxos e surfactantes fosfolipídeos quando na presença de alcanos, como exemplo a produção de fosfatidiletanolamina (Figura 3) por *Acinetobacter* sp. H01-N (Kappeli e Finnerty, 1979).

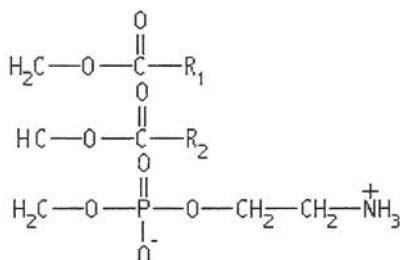


Figura 3: Estrutura da Fosfatidiletanolamina, R₁ e R₂ são cadeias hidrocarbônicas derivadas de ácidos graxos.

- Biosurfactantes particulados:

A atividade surfactante em muitos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e em bactérias patogênicas é atribuída a alguns componentes da superfície celular, os quais podemos destacar a estrutura da prodigiosina em *Serratia* sp. e gramicidinas em esporos de *Bacillus brevis*. Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. quando desenvolvidas em meio com hexadecano, acumulam vesículas extracelulares que possuem função importante na captação de alcanos para a célula, demonstrando elevada atividade surfactante (Karanth *et al.*, 1999) (Figura 4). As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biosurfactantes particulados.

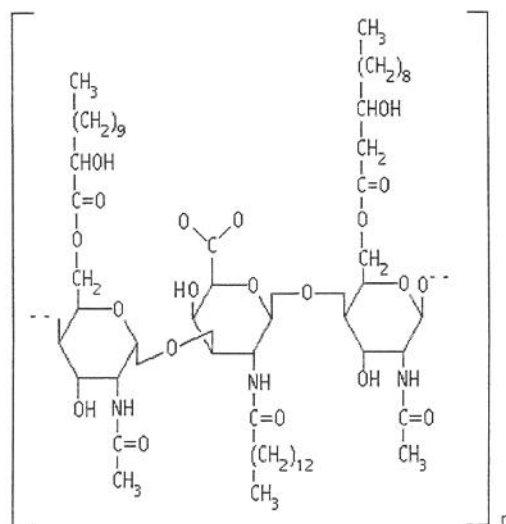


Figura 4: Emulsan, biosurfactante particulado produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*

Tabela 1. Principais classes de biosurfactantes e microrganismos produtores.

Tipo de Biosurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
- ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: Desai & Banat (1997)

3.3 Propriedades e Funções Fisiológicas dos Biosurfactantes:

3.3.1 Propriedades:

Devido à natureza anfipática dos surfactantes, essas moléculas tendem a se associar umas com as outras, formando micelas com superfícies entre fases de diferentes polaridades, como por exemplo, nas interfaces ar e água, óleo e água ou água e sólidos. O efeito nessas interfaces provoca a redução da tensão interfacial do meio (Kock *et al.*, 1989).

A energia livre interfacial é a quantidade mínima de trabalho requerida para criar uma interface. Essa energia livre interfacial por unidade de área é a qual medimos quando

queremos determinar a tensão interfacial entre duas fases, determinando-se a quantidade mínima de trabalho requerida para criar uma unidade de área da interface ou para expandir esta por unidade de área (Rosen, 1971). A Figura 5 representa a força de atração entre as moléculas na superfície e no interior de um líquido.

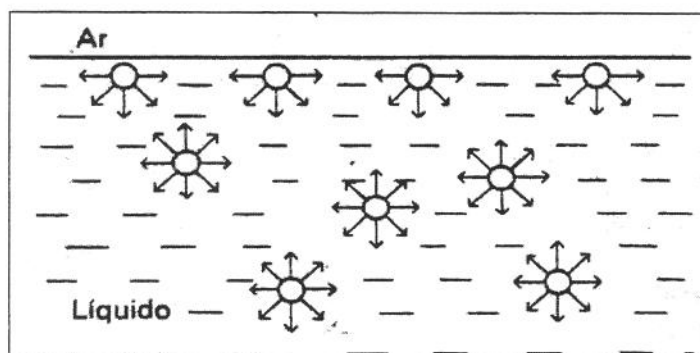


Figura 5: Força de atração entre moléculas de um líquido.

Quando uma molécula anfipática, compostos que possuem em sua estrutura grupamentos hidrofílico e hidrofóbico, é dissolvida em água, seu grupo hidrofóbico distorce a estrutura da água de tal maneira a decrescer a entropia do sistema, sendo que algumas das moléculas são expelidas do solvente e são adsorvidas na interface ao redor da solução. O grupo hidrofílico, entretanto, mantém-se em solução. A natureza anfipática desses compostos faz com que a molécula adsorvida na interface seja orientada, usualmente com a porção hidrofílica voltada para o líquido mais polar (nesse caso a água) e a porção hidrofóbica voltada no sentido contrário, formando uma monocamada orientada nas interfaces ar e água e/ou óleo e água (Rosen, 1971). A Figura 6 mostra a adsorção de moléculas tenso-ativas, onde a parte circular das moléculas representa a parte polar hidrofílica, e a parte retangular representa a cadeia carbônica não-polar.

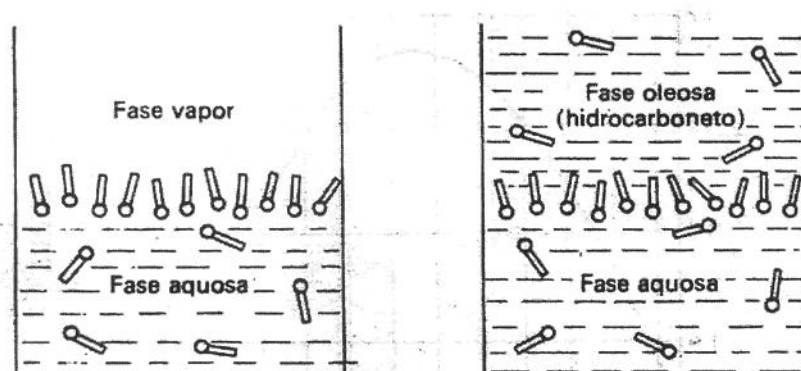


Figura 6: Adsorção de moléculas tenso-ativas, onde a parte circular das moléculas representa a parte polar hidrofílica, e a parte retangular representa a cadeia carbônica não-polar.

A medida de tensão superficial é uma ferramenta comum para monitorar o desenvolvimento de culturas microbianas produtoras de surfactantes. Alguns dados referentes às propriedades de tensão interfacial do meio de cultura fermentado ou do biosurfactante isolado são apresentados na literatura (Tabela 2). No entanto, é difícil comparar ou relacionar esses dados, devido a se tratarem de produtos provenientes de microorganismos específicos, desenvolvidos em condições particulares de cultivo, como por exemplo, tipo e concentração de nutrientes, aeração, etc. Portanto, as propriedades de um biosurfactante dependem da sua estrutura molecular e essa está diretamente relacionada com o microorganismo produtor e com o meio em que esse se desenvolve (Bognolo, 1999).

De acordo com estudos desenvolvidos por Mulligan e Gibbs (1993) a efetividade de um biosurfactante é determinada pela sua habilidade em baixar a tensão superficial, sendo considerado um bom biosurfactante aquele capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial (interface óleo e água) da água em hexadecano de 40 para 1 mN/m. Esses valores estão diretamente ligados a concentração dos compostos com atividade surfactante presentes no meio. No entanto, essa correlação é estabelecida até que se alcance a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a concentração mínima de surfactante necessária para iniciar a formação de micelas (Mulligan e Gibbs, 1993). Valores mais baixos de CMC indicam um surfactante mais efetivo e mais favorável economicamente para uso em processos industriais (Bognolo, 1999). Contudo, a determinação do valor da CMC

exige a obtenção de um surfactante puro, o que é muitas vezes difícil, entretanto é possível determinar a CMC⁻¹ usando o meio de cultura fermentado (Sheppard e Mulligan, 1987).

Tabela 2: Tensão superficial de alguns biosurfactantes específicos.

Surfactante	Concentração (mg/L)	Tensão superficial (mN/m)	Fonte microbiana
Extrato bruto	10 ²	35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Trehalose dicorynornycolatos	10 ²	43	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Fosfatidiletanolamina	n.a.	29	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Ácidos fosfatídicos	n.a.	33	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Extrato bruto	n.a.	26-28	<i>Pseudomonas sp. DMS 2874</i>
Ramnolipídeos 1	1-10	31	<i>Pseudomonas sp. DMS 2874</i>
Ramnolipídeos 2	10 ²	n.a.	<i>Pseudomonas sp. DMS 2874</i>
Ramnolipídeos 3	10	31	<i>Pseudomonas sp. DMS 2874</i>
Ramnolipídeos 4	10 ²	n.a.	<i>Pseudomonas sp. DMS 2874</i>
Manose monoéster	1	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Glicose monoéster	10	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Maltose monoéster	1	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Maltose diéster	10	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Celobiose monoéster	10	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Maltotriose triéster	10 ²	n.a.	<i>Arthrobacter sp. DMS 2567</i>
Caldo fermentado	n.a.	n.a.	<i>PET 1006</i>

Fonte: Bognolo, 1999.

As propriedades interfaciais dos surfactantes dependem da composição iônica da fase aquosa, por exemplo, elevadas concentrações de NaCl inativam os glicolipídeos produzidos por *Torulopsis apicola*. No entanto, a produção de compostos com atividade surfactante por linhagens de *Bacillus liqueniformis* JF-2 não é afetada pela presença de elevadas concentrações de NaCl, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (McInerney *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1990).

Alguns biosurfactantes também exibem excelente estabilidade térmica e química. Estudos realizados por Horowitz *et al.*, 1990 demonstram a estabilidade térmica de um

lipopeptídeo surfactante quando submetido a temperaturas superiores a 75⁰C por mais de 40 h. A estabilidade dos biosurfactantes quanto ao pH encontra-se entre valores de 5,5 e 12, sendo sua atividade diminuída quando submetido a condições muito ácidas (Lin, 1996).

3.3.2 Funções Fisiológicas dos Biosurfactantes

Embora a exata função fisiológica dos biosurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, muitos são considerados como metabólitos secundários, possuindo papel essencial na sobrevivência do microrganismo produtor através da captação de nutrientes para a célula. Isso tem sugerido que a produção de biosurfactante pode aumentar a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e com isso facilitar o desenvolvimento do microrganismo nesses substratos (Francy *et al.*, 1991). No entanto, essa hipótese é contrastada pelo fato de cepas de *Bacillus subtilis* e de outros microrganismos mutantes produzirem biosurfactante somente na presença de substratos hidrossolúveis (Lin, 1996).

Uma estratégia fundamental de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em se adaptar em um meio onde esse possa se desenvolver. Os elementos chave são estruturas localizadas na superfície celular que são responsáveis pela aderência das células às superfícies. Para isso, biosurfactantes são excretados formando um filme na interface, estimulando a aderência do microrganismo e inibindo a aderência de outros. No caso de biosurfactantes ligados a parede celular, essa se torna mais hidrofóbica, estimulando o desenvolvimento do microrganismo quando o substrato, na interface onde a célula está aderida, é um composto insolúvel em água (Rosemberg e Ron, 1999). Zhang e Miller (1994) demonstraram o significativo aumento da hidrofobicidade superficial de células de *P. aeruginosa* devido à ligação de ramnolipídeos à parede celular. Ao contrário de células de *Acinetobacter* sp. que tiveram sua hidrofobicidade diminuída pela presença desses agentes emulsificantes ligados à superfície celular (Rosemberg *et al.*, 1988). Esses dados sugerem que microrganismos podem usar seus biosurfactantes para regular as propriedades superficiais da célula, proporcionando a aderência

desenvolvido em glicose. Isso indicou que o complexo polissacarídeo-ácido graxo ligado à membrana poderia estar envolvido no transporte direto de substratos hidrocarbônicos para a célula.

Vários biosurfactantes, principalmente lipopeptídeos e glicopeptídeos, demonstram atividade antibiótica. A atividade antibiótica dos biosurfactantes pode estar diretamente relacionada com suas propriedades anfipáticas. Muitos deles, como os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* e surfactina produzida por *B. subtilis*, são capazes de solubilizar os componentes de membrana das células. Através da liberação de biosurfactantes no meio, o microrganismo produtor possui uma maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (Lin, 1996).

3.4 Seleção de Microrganismos Produtores de Biosurfactantes

Uma estratégia de seleção eficiente é a chave para o sucesso em um bom isolamento de microrganismos produtores de biosurfactantes. Devido a isso, recentes avanços nessa área têm sido atribuídos ao desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes para a seleção dessas linhagens. Os métodos mais utilizados atualmente envolvem as propriedades químicas e fisiológicas dos biosurfactantes.

A seleção de bactérias produtoras de biosurfactante através de técnicas usando cromatografia em camada delgada (CCD), descrita por Matsuyama *et al.* (1985), é empregada com sucesso para selecionar e isolar microrganismos produtores de biosurfactantes. No entanto, devido a sua baixa sensibilidade, esta técnica não se aplica a cepas produtoras de baixos níveis de surfactante.

Como visto anteriormente, devido a sua natureza anfipática, alguns biosurfactantes possuem atividade hemolítica e/ou antibiótica, e essa propriedade é também utilizada para selecionar microrganismos produtores. O biosurfactante produzido causa a ruptura dos eritrócitos quando o microrganismo é inoculado em placas de Petri contendo ágar sangue (Mulligan e Cooper, 1985; Carrilo *et al.*, 1996). Porém, o uso de placas com ágar sangue promove o desenvolvimento de muitos microrganismos e esses podem excretar tanto biosurfactante como enzimas hemolíticas. Devido a isso, esse método é usado no processo de pré-seleção. Nesse caso, a seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes é completada avaliando-se o abaixamento da tensão superficial do meio de cultura fermentado. Essa técnica consiste em um dos métodos mais efetivos para a seleção de linhagens produtoras

de surfactantes (Mulligan e Cooper, 1985). Estudos realizados por Haba et al., 2000 demonstraram a seleção de diferentes gêneros de bactérias e leveduras utilizando resíduos de óleos vegetais provenientes da indústria de alimentos, onde foram consideradas boas produtoras as linhagens que reduziram a tensão superficial do meio de cultura de 57 para 40 mN/m.

3.5 Produção e Recuperação

3.5.1 Produção

Biosurfactantes são sintetizados como subprodutos metabólicos por bactérias, leveduras e fungos. Eles podem ser produzidos extracelularmente ou como parte da parede celular desses microrganismos (Mulligan e Gibbs, 1993; Kosaric, 1990). É muito difícil descrever uma norma para a produção ótima de biosurfactante, uma vez que esses incluem uma variedade de compostos e podem ser produzidos por várias espécies microbianas (Tabela 1). De acordo com Haferburg *et al.* (1986) os surfactantes microbianos podem ser divididos em três categorias: biosurfactantes produzidos exclusivamente com alcanos como fonte de carbono, tais como *Corynebacterium* sp. e *Arthrobacter* sp.; aqueles biosurfactantes produzidos somente com fontes de carbono hidrossolúveis, como por exemplo biosurfactante de *B. subtilis*; e ainda aqueles os quais são produzidos com alcanos e substratos solúveis em água como fontes de carbono, nesse último caso, podemos citar o biosurfactante produzido por *Pseudomonas* sp.. A compreensão dessas categorias é importante para entender que a estrutura e rendimento do biosurfactante depende da fonte de carbono, bem como da espécie microbiana usada (Parkinson, 1985). Portanto, o desenvolvimento de processos e fermentações devem ser otimizados a cada caso, visando-se maximizar a produtividade, aumentando o rendimento do biosurfactante a partir da fonte de carbono e alcançar elevadas concentrações finais do produto desejado. A otimização da produção é um processo fundamental para reduzir o acúmulo de outros metabólicos que podem interferir nas propriedades físicas e/ou recuperação dos compostos com atividade surfactante (Lin, 1996).

O tipo, propriedade e quantidade de biosurfactante produzido por uma cultura microbiana dependem não somente do microrganismo utilizado como também do substrato disponível. A modificação do substrato frequentemente altera a estrutura do produto e conseqüentemente suas propriedades (Reiser *et al.*, 1989). Os biosurfactantes produzidos por

Arthrobacter paraffineus diferem na sua porção hidrofílica quando o microrganismo é desenvolvido em diferentes fontes de carbono (Lin, 1996). Semelhantemente, a estrutura do ácido graxo dominante nos biosurfactantes pode também estar de acordo com o comprimento da cadeia dos alcanos usados por alguns microrganismos, tais como glicopeptídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (Kretschmer e Wagner, 1983). Em algumas cepas de *Arthrobacter* sp. a fonte de carbono determina a forma na qual o biosurfactante é produzido; quando na presença de etanol ou acetato, 75% do biosurfactante é produzido intracelularmente, enquanto que na presença de hidrocarbonetos toda a produção é extracelular (Reiser *et al.*, 1989).

Tradicionalmente, hidrocarbonetos têm sido usados como substratos para a produção de biosurfactantes e bioemulsificantes, de forma que esses estimulam a produção para o melhor aproveitamento do substrato pela célula (Hommel *et al.*, 1987). Isso foi constatado por Banat *et al.* (1991), utilizando glicose e hidrocarboneto como fontes de carbono, somente quando toda a glicose foi consumida, o hidrocarboneto foi adicionado ao meio e a produção do biosurfactante sofreu um considerável acréscimo, facilitando a dispersão desses compostos hidrofóbicos e aumentando seu aproveitamento pelo microrganismo. Iqbal *et al.* (1995) demonstraram uma excelente produção de glicolipídeos surfactantes utilizando duas linhagens mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* quando na presença de heptadecano.

Outros nutrientes podem afetar a produção de biosurfactantes, tais como fontes de nitrogênio e fosfato, íons metálicos e outros aditivos (Lin, 1996). Isto tem mostrado que a produção de biosurfactante por *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. e *Torulopsis* sp. pode ser regulada pela razão entre a fonte de carbono e nitrogênio ou pela concentração de extrato de levedura, de acordo com estudos realizados por Hommel *et al.* (1987), Cooper e Paddock (1983) e Shabtai e Wang (1989).

A produção de biosurfactantes pode ser estimulada ou inibida pela adição de antibióticos como penicilina e cloranfenicol (Rubinowitz *et al.*, 1982); além disso, a adição de precursores pode modificar a estrutura e o rendimento final do produto (Peypoux & Michel, 1992).

Como qualquer outro processo fermentativo, a temperatura de crescimento, pH do meio e níveis de oxigênio dissolvido ou aeração são efeitos que também influenciam na produção de biosurfactantes (Desai & Banat, 1997). Sheppard & Cooper (1990) concluíram

que a transferência de oxigênio é um parâmetro chave para a otimização e ampliação de escala na produção de surfactina por *B.subtilis*.

Embora o interesse na produção de biosurfactantes vem aumentando nesses últimos anos, devido a suas aplicações e vantagens sobre os surfactantes sintetizados quimicamente, os surfactantes biológicos não são economicamente competitivos. Os biosurfactantes devem competir com surfactantes derivados de petróleo em alguns aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção de acordo com a aplicação de interesse. Devido a isso, determinadas estratégias devem ser exploradas para reduzir os custos da produção, como por exemplo, o uso de substratos de baixo custo para o crescimento de microrganismos e produção de biosurfactante (Makkar e Cameotra, 1999). A escolha de materiais de baixo custo é economicamente importante, devido a esses representarem cerca de 50% do valor do produto final. Porém, o problema na seleção de substratos alternativos envolve a procura de um resíduo que contenha um balanço adequado de carboidratos e lipídeos para alcançar o crescimento ótimo da cultura e produção do biosurfactante (Mercade e Manresa, 1994). Resíduos agroindustriais, com elevados níveis de carboidratos ou lipídeos, bem como águas residuais são materiais requeridos para a produção de biosurfactante. Mercade e Manresa (1994) demonstram a utilização de resíduos provenientes da extração de óleo de oliva para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* JAMM. No entanto, esses resíduos oleosos também podem servir para selecionar microrganismos produtores de surfactante, como mostra o estudo proposto por Haba *et al.* (2000), no qual 36 microrganismos foram selecionados com respectiva produção de surfactante em resíduo de óleo de oliva e girassol. Efluentes da industrialização de batatas são extremamente prejudiciais para o meio ambiente devido a sua elevada carga orgânica, portanto, esse pode servir como substrato para a produção de biosurfactantes. Thompson *et al.* (2000) verificaram a produção de surfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em resíduo proveniente do processamento de batatas, a qual foi consideravelmente maior quando comparada à produção em meio sintético contendo glicose como fonte de carbono. Fox e Bala (2000) concluíram que *B. subtilis* é capaz de produzir biosurfactantes a partir de resíduos de processamento de batatas, através da substituição de fontes de carbono tradicionais.

A utilização de melaço, subproduto do processamento da cana-de-açúcar, foi proposta para a produção de biosurfactante por Makkar e Cameotra (1997) através do estudo de duas

cepas de *B. subtilis*, onde a produção máxima de surfactante foi alcançada em 72 h de fermentação, ao final da fase estacionária para ambas as linhagens.

A produção de biosurfactantes por biotransformação tem recebido considerável atenção nos últimos anos. O principal objetivo deste processo é a alteração de diferentes porções hidrofóbicas e hidrofílicas através de fermentação microbiana e posterior união destas porções por tratamento enzimático obtendo moléculas surfactantes (Desai & Banat, 1997). Segundo Lin (1996) os principais problemas na aplicação de enzimas para a produção de biosurfactantes são o alto custo das enzimas e a dificuldade de solubilização dos substratos hidrofóbicos e hidrofílicos no meio de reação. Por outro lado, a produção de biosurfactantes por fermentação microbiana tem a desvantagem nos altos custos dos processos de recuperação e no grande volume de resíduos gerados.

3.5.2 Recuperação

A recuperação e concentração dos biosurfactantes do meio fermentado representam uma considerável fração dos custos da produção. O processo de separação eficiente é freqüentemente impedido devido à baixa concentração de produto e as características anfipáticas desses compostos. Devido a isso, muitas aplicações são testadas utilizando-se o meio fermentado livre de células ou o surfactante bruto (Lin, 1996).

O isolamento de biosurfactantes produzidos extracelularmente geralmente envolve alguns passos de concentração; enquanto que o isolamento de biosurfactantes associados à membrana ou extracelulares insolúveis em água é relativamente fácil. A recuperação de biosurfactantes fosfolipídicos associados à membrana de *Micrococcus cerificans* foi proposto por Makula e Finnerty (1970), onde esses compostos foram isolados da massa celular através de extração orgânica; ao contrário dos glicolipídeos produzidos por *Torulopsis bombicoides*, os quais são insolúveis em água e podem ser separados do caldo fermentado através de centrifugação (Cooper e Paddock, 1984).

No entanto, a separação de alguns biosurfactantes pode envolver passos simples, tais como a precipitação de surfactina, a qual é feita ajustando-se o pH do meio fermentado livre de células até atingir o ponto isoelétrico do composto (Horowitz *et al.*, 1990). A adição de acetona ou etanol resfriados (Singh e Desai, 1988) ou ainda sais como sulfato de amônio (Rosemberg *et al.*, 1979) ao meio fermentado livre de células também podem ser usados no

processo de precipitação de biosurfactantes. Processos de ultrafiltração têm sido usados com sucesso na recuperação de biosurfactantes (Mulligan e Gibbs, 1990).

Para a recuperação efetiva de biosurfactantes em grande escala ou em processos contínuos podem ser utilizados métodos de adsorção cromatográfica ou resinas de troca iônica (Iguchi *et al.*, 1969), carvão ativado (Hommel *et al.*, 1987) ou adsorventes hidrofóbicos (Lin *et al.*, 1994).

Alguns estudos propõem a purificação do biosurfactante recuperado utilizando-se técnicas que envolvem cromatografia líquida com sílica gel, filtração em gel com resinas lipofílicas tais como Sephadex, e cromatografia em camada delgada (Lin *et al.*, 1994; Horowitz *et al.*, 1990).

3.6 Aplicações Industriais

Como descrito anteriormente, os biosurfactantes apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como por exemplo, a grande diversidade de estruturas químicas com propriedades características que possibilitam o uso desses compostos para aplicações específicas. A aplicação comercial dos biosurfactantes é determinada pelos seus custos e propriedades em relação aos sintéticos. Atualmente, o uso de biosurfactantes em alimentos e indústrias químicas geralmente não é competitivo devido ao seu alto custo de produção (Reiling *et al.*, 1986). Entretanto, o balanço econômico em favor de surfactantes produzidos por via microbiana tem recebido especial atenção nessa última década, principalmente devido à agressão ao meio ambiente gerada pelos surfactantes sintéticos (Kachholtz e Schlingmann, 1987). Algumas das principais aplicações comerciais dos biosurfactantes são mostradas na Tabela 3.

No entanto, uma série de outras aplicações industriais desses compostos tem sido investigada, como mostra o estudo realizado por Horowitz e Currie (1990), através do qual o biosurfactante BL-86 produzido por *B. licheniformis* 86 mostrou ser um excelente dispersante em processos cerâmicos. No entanto, o uso potencial dos biosurfactantes está na indústria de óleos, onde o nível de pureza exigido é muito baixo, podendo muitas vezes, ser usado o próprio meio fermentado livre de células (Desai e Banat, 1997). Quando comparados aos surfactantes químicos, os biosurfactantes são muito mais seletivos, requeridos em menor quantidade e muito mais efetivos na recuperação de óleo bruto e na limpeza de reservatórios.

Dados apresentados por Rapp *et al.* (1987) demonstram um aumento de aproximadamente 30% na recuperação total de óleo bruto através do uso de trehalolipídeos produzidos por *Nocardia rhodochrous*. No entanto, estudos realizados por Pruthi e Cameotra (2000) evidenciam a habilidade de um novo sacarose-lipídeo produzido por *S. marcescens* em remover 90% do óleo residual, presente em uma coluna empacotada com areia impregnada com óleo, após a passagem de uma solução contendo o biosurfactante, sugerindo o seu uso potencial nessa área.

O aumento na recuperação de óleo tem sido considerada uma das mais importantes áreas de aplicação de biosurfactantes. A mobilização de óleo em um tubo depois da passagem de soluções de surfactante tem sido uma prática comum nas indústrias petrolíferas há bastante tempo. Entretanto, a recuperação *in situ*, através da aplicação do próprio microrganismo produtor de biosurfactante no meio contendo óleo, oferece algumas vantagens sobre o processo anterior. Embora não seja completamente elucidado o exato mecanismo pelo qual o desenvolvimento do microrganismo *in situ* facilita o escoamento do óleo. Horowitz e Currie (1990) acreditam que a produção de biosurfactante e polímeros no meio sejam responsáveis pelo aumento da recuperação do óleo. De acordo com Karanth *et al.* (1999), a capacidade dos biosurfactantes de reduzir efetivamente a tensão interfacial pode estar relacionada com a habilidade desses compostos em aumentar a recuperação de óleo bruto.

A dispersão e/ou solubilização de poluentes insolúveis em água é um passo importante na biorremediação. Alguns estudos têm mostrado a aplicação de biosurfactantes no sentido de aumentar a biodisponibilidade e biodegradação de poluentes hidrofóbicos presentes em solos contaminados (Lin, 1996). Scheibenbogen *et al.* (1994) evidenciaram que o uso de rhamnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* UG2 foram capazes de remover tanto poluentes alifáticos como poluentes aromáticos presentes em solo. Recentemente estudos demonstraram o uso de biosurfactantes também na remoção de metais pesados em solos contaminados, onde Mulligan *et al.* (1999) comprovaram a remoção de cobre em mais de 70% e de zinco em aproximadamente 25% usando o biosurfactante surfactina produzido por *B. subtilis* ATCC 21332.

Biosurfactantes também possuem algumas aplicações promissoras como aditivos na indústria de alimentos. Um oligossacarídeo sintetizado por Bloomberg (1991) tem sido largamente usado como emulsificante na indústria de alimentos. O novo bioemulsificante de

Candida utilis descrito por Shennan e Levi (1987) tem sido incorporado como um dos ingredientes em saladas desidratadas.

Na indústria de cosméticos e na saúde os biosurfactantes também encontram espaço (Klekner e Kosaric, 1993). Estudos realizados por Mutua e Akoh (1993) mostram que um produto contendo 1 mol de soforolipídio e 12 mols de propileno glicol possui excelente compatibilidade com a pele e é comercialmente usado como umectante. Monoglicerídeos, um dos grupos de surfactantes mais usados na indústria cosmética, tem sido produzidos por *P. fluorescens* a partir de glicerol com rendimentos de aproximadamente 90%. Contudo, o efeito antibiótico e inibitório de alguns vírus em leucócitos por biosurfactantes, tem sido proposto como uma das aplicações desses compostos (Desai e Banat, 1997). Estudos realizados por Uchida *et al* (1989) relatam que o biosurfactante produzido por *R. erythropolis* foi capaz de inibir o vírus do herpes simples e o vírus parainfluenza. Thimon *et al.* (1995) descreveram um biosurfactante com atividade antifúngica chamado de iturina, um lipopeptídeo produzido por *B. subtilis* que afeta a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. De acordo com Banat *et al.* (2000), os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*, e os lipopeptídeos de *B. subtilis* e *B. licheniformis* apresentam atividade antimicrobiana.

Atualmente especial interesse tem sido dado a aplicação de surfactantes no aumento da atividade hidrolítica de enzimas lipases. Lai e O'Connor (2000) relataram o significativo aumento na capacidade hidrolítica de uma lipase pré-gástrica quando na presença de surfactante, sugerindo que esse atua como um solubilizante, dissolvendo e aumentando a concentração do substrato no meio reacional. Esse efeito solubilizante dos compostos com atividade surfactante também foi constatado por Mørkbar *et al.* (1999) quando propuseram o processo de remoção de tinta a base de óleo de soja em papel para reciclagem, confirmando a eficiência da combinação de uma lipase produzida por *P. aeruginosa* com um surfactante neutro. A influência de surfactante também tem sido descrita no aumento da eficiência da lipase de *Candida rugosa* na hidrólise enantioseletiva de fármacos, onde uma concentração de 3% do surfactante aumentou a atividade da enzima em 15 vezes, enquanto a razão enantiomérica aumentou de 8 para 100 na presença de 8% do surfactante (Liu *et al.*, 2000). Yasuda *et al.* (2000) verificaram o efeito de aditivos no aumento da atividade de transesterificação da lipase de *Rhizopus chinensis*, indicando que alguns surfactantes são capazes não somente de aumentar a solubilidade da enzima, como também aumentar sua

estabilidade no meio reacional, sendo esse último um fator chave nas reações de transesterificação. No entanto, Mogi *et al.* (1999) verificaram um aumento significativo da atividade hidrolítica e de interesterificação de algumas lipases quando essas foram modificadas com surfactante, sugerindo que esse aumento está relacionado com a compatibilidade estrutural dos dois compostos, enzima e surfactante. Porém, estudos futuros são necessários para se determinar qual a melhor estrutura do surfactante para que a enzima apresente a sua melhor atividade.

Tabela 3: Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, aditivos para óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes umectantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Banat (2000), Banat *et al.* (2000).

3.7 SERRAWETINA

Algumas bactérias do gênero *Serratia* sp. são capazes de excretar compostos com atividade surfactante (Matsuyama *et al.*, 1987). Dentre esses, um lipopeptídeo produzido por *S. marcescens* foi primeiramente isolados por Matsuyama *et al.* (1986a) e denominado Serrawetina. Serrawetina W1, produzido principalmente por linhagens de *S. marcescens* pigmentadas, é um ciclopeptídeo com atividade surfactante idêntico ao composto

descoberto por Wasserman *et al.* (1961) o qual foi denominado como serratamolide. Porém, outros tipos de serrawetinas têm sido descritos, como por exemplo serrawetinas W2 e W3 produzidos por *S. marcescens* NS25 e NS45, respectivamente. Esses compostos diferem principalmente na sua estrutura molecular. Serrawetina W1 possui uma estrutura molecular simétrica, composta de 2 mols de serina e 2 mols de ácidos 3-hidróxidecanóicos (Matsuyama *et al.*, 1985; Wasserman *et al.*, 1961), enquanto que as serrawetinas W2 e W3 apresentam uma estrutura cíclica assimétrica composta de alguns aminoácidos e ácidos graxos (Matsuyama *et al.*, 1986b). A estrutura molecular da serrawetina W2 é apresentada na Figura 7. Serrawetina W1, W2 e W3 foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 32,2; 33,9 e 28,8 mN/m, respectivamente. A quantidade desses biosurfactantes recuperados foi de 15 a 17% do peso seco da massa bacteriana. Entretanto, as propriedades fisiológicas desses exolipídeos não são ainda conhecidas (Matsuyama *et al.*, 1986b).

Pruthi e Cameotra (1997), Pruthi e Cameotra (2000) estudaram a produção de um biosurfactante produzido por *S. marcescens* MTCC86 em meio contendo 2% de glicose, o qual apresentou a capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultura de 68 para 27 mN/m, demonstrando uma atividade emulsificante de 100 e 85% para querosene e óleo bruto, respectivamente.

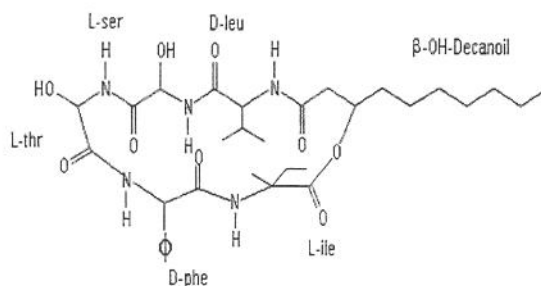


Figura 7: Estrutura Molecular do BS produzido por *S.marcescens* (serrawetina W2)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção de biosurfactante

Em estudos anteriores realizados pelo laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp foram isoladas bactérias de vários locais e origens. Dos microrganismos isolados, dez foram selecionados como produtores de biosurfactante, utilizando-se como indicativo da produção deste composto a análise da atividade hemolítica dos microrganismos (Carrilo e Mardaraz, 1996).

A produção de biosurfactante foi realizada em escala de bancada, adicionando-se 1 mL do inóculo em 15 mL de meio de cultivo (chamado Meio Base) composto de 3% de glicose Synth; 3% de NaCl Synth; 0,1% $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0,025% MgSO_4 ; 0,1% de extrato de leveduras Difco e 1% de solução de minerais (composição em g/L: MnSO_4 3,00; FeSO_4 0,10; CaCl_2 0,10; CoCl_2 0,10; ZnSO_4 0,10; CuSO_4 0,01; H_3BO_4 0,01; NaMnO_4 0,01) em tampão fosfato 0,2 M – pH 7,0 e temperatura de 30°C em estufa Fanen modelo 002 CB por 72 h a 150 rpm em agitador rotativo Fermentation Designers Inc. Após o período de incubação, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 10.000 rpm por um período de 15 minutos em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21, então mediu-se a tensão superficial do sobrenadante.

O inóculo foi preparado utilizando-se uma alça da cultura pura, proveniente de um crescimento prévio de 24 h em ágar nutriente Merck. Em seguida o microrganismo foi inoculado em frasco erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de caldo nutriente e incubado por 24 h a 30°C em agitador rotativo Fermentation Designers Inc., com uma rotação de 120 rpm. Após, o inóculo de todas as culturas foi padronizado em aproximadamente 0,3 de absorbância a 610 nm em espectrofotômetro Coleman, 295 E.

4.2 Determinação da Tensão Superficial

Para a medida da tensão superficial utilizou-se um tensiômetro Kruss Processor Tensiometer K12 V3.11. As análises foram realizadas pelo método de placa de platina iriada com perímetro de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy. As condições de análise foram: volume médio da amostra 10 mL, temperatura ambiente, intervalos de medidas de 15 segundos e desvio padrão referente a 5

medidas de $\leq 0,20$ mN/m. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada, cujo valor encontra-se em torno de 72 mN/m.

4.3 Determinação da Concentração Micelar Diluída (CMD)

A Concentração Micelar Diluída foi utilizada como indicativo da concentração do biosurfactante, onde menores valores de CMD^{-1} e CMD^{-2} representam uma maior quantidade de biosurfactante produzido. A determinação das CMDs foi realizada diluindo-se 10 e 100 vezes o meio fermentado livre de células, respectivamente. A medida da tensão superficial foi realizada como descrito no item 4.3.

4.4 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC):

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é definida como a quantidade mínima de surfactante necessária para se iniciar a formação de micelas em solução.

A determinação da CMC foi feita segundo método descrito por Sheppard e Mulligan, 1987. O método baseia-se em medidas de tensão superficial de diluições sucessivas do meio fermentado livre de células em água destilada, até que seja atingida uma tensão superficial próxima da água (72 mN/m). Através dos valores encontrados de tensão superficial para cada diluição foi possível contruir um gráfico da Tensão superficial (mN/m) x Concentração de meio fermentado (%). Como ilustrado na Figura 8, uma linha foi traçada de B até interceptar a tangente E – F em um ângulo de 90° . O ponto D indicado na Figura 8 corresponde a CMC para a concentração de meio fermentado, ou o mesmo que CMC^{-1} .

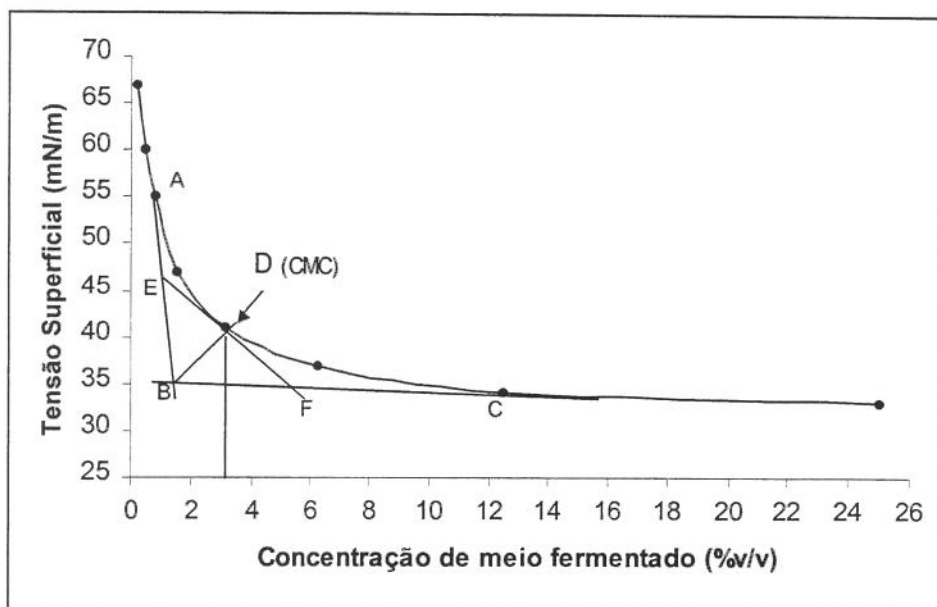


Figura 8: Método gráfico para a Determinação da CMC (Sheppard e Mulligan, 1987).

4.5 Identificação do microrganismo produtor

Entre os dez microrganismos isolados testados, o que apresentou maior interesse como produtor de biosurfactante foi a bactéria denominada inicialmente de LB006, a qual foi posteriormente identificada de acordo com o Manual de Bacteriologia Determinativa, Bergey's (1994).

Os testes iniciais de identificação (características macroscópicas e microscópicas) do isolado LB006 foram realizados com culturas de crescimento de 24 h a 30°C em estufa Fanen modelo 002 CB, em meio ágar nutriente Merck, de forma a se obter o maior número possível de células viáveis.

4.5.1 Características morfológicas

4.5.1.1 Morfologia macroscópica das colônias

As observações macroscópicas se relacionam aos tipos característicos de colônias e de crescimento de um modo geral, nos seguintes aspectos:

- Tamanho das colônias:** pode ser caracterizado em seu diâmetro por milímetros (mm)
- Forma:** puntiforme, circular, filamentosa, rizóide e fusiforme

- Elevação:** plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme e umbelicada
- Margem:** inteira, ondulada, lobada, crenada, filamentosa e ondeada
- Superfície:** lisa, rugosa, mucóide, seca e pulverulenta
- Densidade:** opaca, translúcida, transparente e brilhante
- Cromogênese:** pigmentada ou não
- Cor:** amarela, preta, branca, vermelha, etc...
- Odor:** presente ou ausente
- Consistência:** butirosa, viscosa, quebradiça ou membranosa

4.5.2 Características microscópicas

As características microscópicas das bactérias são de extrema importância na identificação, pois com uma simples coloração de GRAM e com a forma das células vegetativas já se pode muitas vezes determinar a que gênero uma bactéria pertence.

- **GRAM + ou -**
- Forma das células vegetativas:** bastonetes, cocos
- Presença ou ausência de esporos**
- Forma dos esporos:** ovais, cilíndricos
- Esporos:** entumescidos ou não

4.5.3 Características fisiológicas

4.5.3.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Em tubos de ensaio contendo caldo nutriente, inoculou-se 1 mL de uma suspensão da bactéria a ser identificada com densidade +2 na escala de Mac Farland. Cada um dos tubos foram incubados em diferentes temperaturas de crescimento como 5°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C e 55°C, de modo a se observar o crescimento do microrganismo nessas diferentes temperaturas.

4.5.3.2 Requerimento de oxigênio

O método de requerimento de oxigênio consiste na retirada do oxigênio dissolvido no meio e a vedação completa do tubo. O meio utilizado para este teste foi o meio de tioglicolato,

o qual foi fervido até o desaparecimento do halo vermelho (rosa) provocado pelo indicador, a rezazurina, na presença de oxigênio. Após o esfriamento do meio, o microrganismo foi inoculado por picada e incubado à 37°C (determinada como temperatura ótima para o crescimento do microrganismo no item 4.5.3.2). O tubo teste foi então vedado com vaselina sólida.

4.5.3.3 Teste de osmotolerância - requerimento de cloreto de sódio

A osmotolerância da bactéria foi testada utilizando-se um gradiente de solução em caldo nutriente contendo as seguintes concentrações de NaCl: 0%, 2%, 5%, 7% e 10%. Em seguida inoculou-se 1 mL de uma suspensão do microrganismo com densidade +2 na escala de Mac Farland em cada um dos tubos e observou-se o crescimento no meio após 24 e 48 h de incubação em estufa a 37°C.

4.5.4 Características Bioquímicas

Após a realização dos testes anteriores, verificou-se que o microrganismo em estudo tratava-se de uma enterobactéria. Devido a isso, os testes bioquímicos seguintes foram realizados de acordo com o Manual de Bacteriologia Determinativa, Bergey's (1994) para identificação dessa classe de bactérias. Com essa informação, tornou-se possível também a escolha de um kit para identificação (Kit API 20E).

4.5.4.1 Hidrólise do amido

A linhagem LB006 foi inoculada por picada em placas de Petri estéreis contendo 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne, 1% de amido solúvel e 1,5% de ágar e após 72 h de incubação a 37°C adicionou-se o reagente lugol, onde foi observado a presença ou ausência de halo transparente ao redor das colônias.

4.5.4.2 Hidrólise da gelatina

As bactérias que produzem gelatinase podem ser detectadas observando-se a liquefação do meio contendo gelatina. Esse teste foi realizado através do Kit API 20E, inoculando-se uma suspensão da linhagem LB006 com densidade +0,5 na escala de Mac Farland. Em seguida incubou-se o Kit a 37°C por 18 a 24 h.

4.5.4.3 Teste da produção da enzima catalase

A presença da enzima foi testada através da adição de 2 a 3 gotas de uma solução a 3% de H_2O_2 sobre uma lâmina contendo um esfregaço da cultura a ser identificada. A formação imediata de bolhas quando se adiciona a H_2O_2 sobre a cultura indica a produção da catalase.

4.5.4.4 Teste da produção da enzima citocromo oxidase

Este teste foi realizado utilizando-se papel filtro onde foi colocado uma pequena quantidade da cultura a ser identificada com a ajuda de um bastão de vidro estéril e em seguida adicionou-se uma gota do reagente dicloridrato de p-fenilenodiamina. A mudança de coloração das colônias após a adição do reativo indica teste positivo.

4.5.4.5 Prova do indol

As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano. A prova do indol está baseada na formação da cor vermelha após a adição de 1 a 2 gotas do reagente de Kovac's (p-dimetilaminobenzaldeído). Este teste foi realizado utilizando-se o Kit API 20E, nas condições descritas no item 4.5.4.2.

4.5.4.6 Utilização de citrato

Este teste foi realizado através do Kit API 20E, inoculando-se o microrganismo a ser identificado em tubos inclinados contendo meio de cultura estéril composto por 0,02% $MgSO_4$; 0,1% $NH_4H_2PO_3$; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,2% citrato de sódio; 0,5% NaCl; 1,5% ágar e 0,08 g de azul de bromotimol, com pH ajustado para 7,0. O isolado foi posteriormente incubado em estufa a 37°C por 24 h.

4.5.4.7 Prova de Voges-Proskauer

Este teste foi realizado utilizando-se o Kit API 20E, nas condições descritas no item 4.5.4.2, no qual após o período de incubação adicionaram-se os reagentes KOH 40% e α -naftol, respectivamente. O aparecimento de um halo vermelho indica teste positivo.

4.5.4.8 Prova da urease

Para a verificação da presença desta enzima, utilizou-se o Kit API 20E, nas condições descritas de acordo com o item 4.5.4.2. A mudança de coloração do meio indica teste positivo.

4.6 Curva de Crescimento e Padronização do Inóculo

Partindo-se de um tubo inclinado contendo a cultura em ágar nutriente, transferiu-se a maior quantidade desta com a ajuda de uma alça de platina para um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio caldo nutriente, o qual foi posteriormente incubado por 24 h em shaker (120 rpm, 30°C). Após este período, transferiu-se 1,5 mL do meio contendo a linhagem LB006 para 300 mL de meio caldo nutriente previamente esterilizado e distribuiu-se 15 mL desse volume para frascos erlenmeyers de 50 mL, incubando-se estes últimos em agitador shaker (120 rpm, 30°C) em diferentes tempos. As amostras foram retiradas em intervalos regulares de 1 h e medida a densidade ótica a 610 nm, bem como feita a contagem de células viáveis pelo método da gota, na qual uma gota foi padronizada em 15 µL. Com isso, foi possível a obtenção de uma curva de crescimento e determinação das fases logarítmica, estacionária e de morte do microorganismo em estudo.

4.7 Seleção do Meio de Produção

O microrganismo selecionado (LB006) foi identificado como *Serratia marcescens*. Com o objetivo de melhorar a produção de biosurfactante, testaram-se alguns meios citados em estudos realizados anteriormente nos quais foram utilizadas linhagens do mesmo gênero:

- Meio 1 (Matsuyama *et al.*, 1985): 0,5% peptona bacteriológica Difco; 1% glicerol Synth; pH 7,2.
- Meio 2 (Pruthi & Cameotra, 1997): 0,2% KH_2PO_4 ; 0,5% K_2HPO_4 ; 0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2% NaNO_3 ; 0,01% NaCl ; 2% sacarose Synth; pH 7,2.
- Meio 3 (Lindum *et al.*, 1998): Meio mínimo supelmentado com 0,5% de casamino ácidos e 0,5% de glicose Synth; pH 7,0.
- Meio 4 (Suzuki *et al.*, 1993): 1% de extrato de carne Merck; 1% de peptona bacteriológica Difco; 0,2% de L-metionina; 0,2% de L-histidina; 0,2% de L-arginina; 0,25% de NaCl Synth; pH 6,5.

4.8 Otimização da produção de biosurfactante por *Serratia marcescens* LB006

A metodologia do planejamento experimental fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamental na teoria estatística por fornecer informações

muito mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erros (Barros Neto *et al.*, 1996).

Através desta técnica sistemática de condução de experimentos é possível avaliar os efeitos principais das variáveis nas respostas desejadas, bem como a interação entre elas. A partir da análise de variância pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlaciona as respostas em função das variáveis estudadas, construindo-se as superfícies de resposta para determinar as faixas ótimas de operação. Nem sempre o objetivo do trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as respostas do sistema frente às variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operação estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a verificação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e conseqüentemente na definição da melhor estratégia de controle operacional.

Após ter selecionado o melhor meio (Meio 1: peptona/glicerol) para produção do biosurfactante pela linhagem LB006, fez-se um planejamento experimental fatorial com o objetivo de otimizar as melhores condições para a produção do biosurfactante.

4.8.1 Determinação da temperatura ótima em ensaio univariável

Este experimento teve como objetivo verificar quais os níveis a serem estudados posteriormente no planejamento fatorial fracionário para a variável temperatura. Para isso, testaram-se as temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C.

Devido a pouca quantidade de amostra resultante dos ensaios realizados em frascos erlenmeyers de 50 mL, nessa etapa do estudo, os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL de meio de produção com 5 mL de inóculo, sendo as proporções de meio e inóculo mantidas quando comparadas aos ensaios anteriores.

Aos frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL de meio de produção constituído de 0,5% peptona bacteriológica Difco e 1% glicerol Synth, pH 7,2 foram inoculados 5 mL da cultura padronizada (10^9 UFC/mL) e os mesmos foram incubados em agitador tipo shaker com uma rotação de 150 rpm para as diferentes temperaturas.

Após 72 h de incubação, o meio fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21. A produção de biosurfactante foi

avaliada de acordo com medidas de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} do caldo fermentado livre de células, de acordo com os itens 4.2 e 4.3.

4.8.2 Determinação do pH ótimo em ensaio univariável

O pH inicial do meio de produção foi variado de 3,0 a 12,0 com o objetivo de determinar os níveis de pH a serem estudados posteriormente no planejamento fatorial fracionário. As condições desse ensaio foram iguais às descritas no experimento anterior, item 4.8.1.

4.8.3 Planejamento fatorial e “Screening Design”

A análise univariável ou o estudo de uma variável por vez mantendo as outras constantes, dificulta grandemente a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material e, principalmente a falta de uma conclusão baseada em uma metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relaciona-se ao efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só podem ser obtidas pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma nova vantagem do planejamento fatorial é a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo.

Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com dois níveis (-1 e +1) para cada variável. Uma particularidade muito grande em processos bioquímicos é o grande número de variáveis envolvidas. Os planejamentos fatoriais são muito úteis nas etapas prévias de um desenvolvimento de processo, por exemplo, para identificação das variáveis mais relevantes que devem entrar num planejamento completo numa etapa posterior. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve a partir de um planejamento fracionado otimizar o processo. Isto porque os efeitos principais, na verdade contrastes, estão confundidos com interações de 2ª ou 3ª ordem ou superiores conforme o tipo de resolução do fracional (Barros Neto *et al.*, 1996).

4.8.4 Planejamento fatorial fracionário

O processo de otimização da produção de biosurfactante pela linhagem de *S. marcescens* LB006 iniciou-se através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 4 pontos centrais, tendo-se como finalidade avaliar os efeitos das variáveis estudadas. Nesse primeiro planejamento as variáveis estudadas foram temperatura, pH e concentração dos componentes do meio de produção, os quais foram glicerol e peptona (Tabela 4).

Partindo-se dos resultados encontrados nos ensaios univariáveis para temperatura e pH inicial, e das concentrações de peptona e glicerol descritos na literatura e anteriormente testados, determinaram-se os níveis das variáveis estudadas nesse primeiro planejamento (Tabela 5).

Tabela 4: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e pontos centrais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Ensaios	Temperatura	pH _{inicial}	Glicerol	Peptona
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

Tabela 5: Níveis das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Variável	-1	0	+1
Temperatura (°C)	25	30	35
pH	6,0	7,2	8,4
Glicerol (%)	0,5	1,0	1,5
Peptona (%)	0,25	0,5	0,75

Foram inoculados 5 mL da cultura contendo 10^9 UFC/mL em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL de meio. As amostras foram coletadas após 24, 48 e 72 h de incubação em agitador rotativo a 150 rpm nas condições especificadas para cada ensaio de forma a se avaliar a influência do tempo na produção. A resposta dos ensaios realizados nesse experimento foram medidas em relação ao abaixamento da tensão superficial do meio fermentado livre de células quando comparada a medida da tensão superficial do meio sem inóculo.

4.8.5 Planejamento fatorial completo

Após a determinação do efeito das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário, partiu-se para o planejamento fatorial completo, visando à determinação da faixa ótima de produção de biosurfactante pelo microrganismo em estudo.

As variáveis estudadas nesse experimento foram peptona e glicerol (Tabela 6) e os níveis são apresentados na Tabela 7.

As condições de incubação e análise dos ensaios foram as mesmas citadas no item 4.8.4, bem como as proporções de inóculo e volume de meio. As amostras foram coletadas após 48, 72 e 96 h de incubação.

Tabela 6: Planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Ensaio	Glicerol	Peptona
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	-1,41
6	0	+1,41
7	-1,41	0
8	+1,41	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 7: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Glicerol (%)	0,586	1,0	2,0	3,0	3,414
Peptona (%)	0,038	0,1	0,25	0,4	0,462

4.9 Curva de produção de biosurfactante x tempo de fermentação

Após a determinação da faixa ótima de produção e através de uma cinética, foi possível determinar o tempo necessário para alcançar a produção máxima do biosurfactante, bem como relacioná-la com o crescimento da linhagem produtora. A produção foi avaliada de acordo com a determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) para cada ponto e com o índice de emulsificação (E_{24}).

Nesse experimento foram inoculados 5 mL da cultura padronizada em cada frasco erlenmeyer contendo 75 mL nas condições otimizadas no planejamento e incubados em agitador rotativo a 150 rpm. As amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Depois de centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21, as amostras foram submetidas às análises.

4.10 Influencia de óleos vegetais na produção do biosurfactante

Após a seleção e otimização do meio de produção de biosurfactante para a linhagem LB006, o mesmo foi suplementado com 0,1% de óleos vegetais comerciais, como óleo de oliva, girassol, soja, milho, mamona e gordura de coco. Os frascos erlenmeyers, contendo 75 mL do meio e inoculados com 5 mL da cultura em estudo, foram incubados em agitador rotativo Fermentation Designers Inc. a 37°C, 150 rpm durante 72 h. O tempo de incubação foi determinado no experimento 4.9. A influência dos óleos vegetais na produção do biosurfactante foi avaliada através de medidas de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} , como descrito nos itens 4.2, 4.3 e 4.4; respectivamente.

4.11 Influência da adição de petróleo e de hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia na produção do biosurfactante

A linhagem de *S. marcescens* LB006 foi inoculada em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL do meio nas condições ótimas estabelecidas nos itens 4.8 e 4.9. O meio foi suplementado com hidrocarbonetos Merck de cadeia saturada e linear (alcanos) de diferentes tamanhos (petróleo, C10, C14, C16, C18, C20 e C28) na quantidade de 0,5 %. Para todos os meios constituídos dos diferentes tipos de hidrocarbonetos mediu-se a tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} das amostras centrifugadas, conforme o procedimento descrito nos itens 4.2, 4.3 e 4.4.

4.12 Produção de biosurfactante por *S. marcescens* LB006 em resíduos industriais

Nesse experimento foi testado a capacidade da linhagem em estudo em produzir biosurfactante em resíduos industriais provenientes da indústria de alimentos, os quais foram: Manipueira (resíduo líquido gerado no processamento de mandioca para obtenção de farinha), melaço diluído (Brix = 3 %), soro de leite e resíduos gerados em abatedouro de frango (RPB1 = com aproximadamente 3% de gordura, RPB2 = com aproximadamente 10% de gordura e subproduto proveniente de víceras fritas = GPB). Os dados relacionados a porcentagem de gordura dos resíduos foram fornecidos pela empresa Pena Branca – Jaguariúna, a qual cedeu o material para esse experimento.

4.13 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante do biosurfactante produzido foi determinada através do Índice de Emulsificação (E_{24}), misturando-se em tubo de ensaio 6,0 mL de diferentes amostras de óleo (querosene, óleo de soja comercial e hexadecano) com 4,0 mL do meio fermentado livre de células. A seguir, o tubo foi agitado em vortex vigorosamente por 2 minutos como descrito por Abu-Ruwaida *et al.* (1991). A estabilidade da emulsão foi medida após 24 h em termos de porcentagem de emulsão, a qual é definida pela medida da altura da emulsão formada, dividida pela altura total da mistura e multiplicada por 100.

4.14 Determinação da estabilidade térmica do biosurfactante produzido

Os testes de estabilidade do biosurfactante foram realizados conforme descrito por Abu-Ruwaida *et al.* (1991), onde o meio fermentado livre de células foi submetido a diferentes temperaturas (10°C, 30°C, 40°C, 60°C, 90°C e 120°C) durante um intervalo de tempo de 15 minutos. A tensão superficial das amostras foram medidas antes e depois do tratamento térmico.

4.15 Efeito do pH na estabilidade do biosurfactante produzido

A verificação da influência do pH na estabilidade do biosurfactante produzido seguiu o procedimento descrito por Abu-Ruwaida *et al.* (1991). O pH de várias amostras de meio fermentado livre de células foi ajustado através de um potenciômetro Digimed TE - 902 usando soluções de HCl e NaOH, ambos na concentração de 1 M. Os pHs testados foram 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0.

4.16 Recuperação do biosurfactante produzido

Após a centrifugação do meio fermentado como descrito no item 4.1, o sobrenadante foi extraído com clorofórmio:metanol Merck na proporção de 3:1, e a fração orgânica coletada, seca com CaCl_2 anidro e evaporada em rotaevaporador. O sólido obtido foi seco em bomba de vácuo apropriada para retirada de resíduos de solvente. Nesse experimento seguiu-se o procedimento citado por Matsuyama *et al.* (1992).

4.17 Aplicação do biosurfactante produzido

A partir da obtenção do biosurfactante bruto, tornou-se possível testar sua influência na atividade da lipase produzida por *Rhizopus* sp..

4.17.1 Influência da adição do biosurfactante na atividade da lipase em diferentes substratos

Os testes foram realizados em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo: 5 U da enzima, 0,5% do biosurfactante, 1 g de substrato e 2 mL de tampão citrato/fosfato pH 5,5. As condições de reação foram 50°C em banho shaker durante 2 h, as quais foram pré estabelecidas como ótimas para atuação da enzima. Após esse período, a reação foi paralizada pela adição de 15 mL de uma solução acetona:etanol (1:1, em volume) e as amostras foram tituladas com KOH 0,05 N usando fenolftaleína como indicador. Os resultados foram comparados com um branco constituído de 1 g do substrato e 4 mL de tampão. Os substratos testados nesse ensaio foram: gordura de coco, resíduos e subproduto provenientes do abate de frangos (item 4.12). A porcentagem de hidrólise foi calculada por comparação com o número de saponificação de cada substrato, determinado como a seguir: 5 g do substrato foram adicionados de 150 mL de KOH alcoólico 1N. Essa mistura foi aquecida ao ponto de ebulição por 20 minutos, resfriada à temperatura ambiente e titulada contra HCL 1N. A quantidade de KOH (em mg) necessária para completa saponificação do substrato (número de saponificação) foi calculada por diferença.

4.17.2 Determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante

Nesse experimento determinaram-se a melhor concentração de enzima e biosurfactante necessária para obtenção de 100% de hidrólise do substrato gordura de coco. Para isso, foi feito um planejamento experimental fatorial completo onde as variáveis e seus níveis são apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. As condições de temperatura, agitação, quantidade de substrato, tipo e volume de tampão dos ensaios foram as mesmas descritas no item 4.17.2. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers de 50 mL. Tomou-se como resposta nesse planejamento experimental a porcentagem de hidrólise obtida para cada ensaio. Para todos os ensaios foi feito um branco como descrito no item 4.17.1.

Tabela 8: Planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para determinação da melhor concentração de enzima e de biosurfactante.

Ensaio	Enzima Lipase	Biosurfactante
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	-1,41
6	0	+1,41
7	-1,41	0
8	+1,41	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 9: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para determinação da melhor concentração de enzima e de biosurfactante.

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Enzima Lipase (mg/mL)	4,72	8,00	16,00	24,00	27,28
Biosurfactante (%)	0,00	0,10	0,35	0,6	0,70

4.17.3 Influência da adição de surfactantes químicos na atividade da lipase

Após verificada a influência do biosurfactante produzido pela linhagem de *S. marcescens* LB006 na atividade da enzima lipase produzida por *Rhizopus* sp., comparou-se a influência da adição de surfactantes sintetizados quimicamente na atividade da mesma enzima. Esse experimento foi realizado nas mesmas condições reacionais e de análise descritas para o biosurfactante. Os surfactantes testados foram Triton x-100 e Tween 20 na mesma concentração ótima encontrada para o biosurfactante no experimento 4.17.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para a seleção do microrganismo estudado nesse trabalho, foi analisado a capacidade de produção de biosurfactante em meio de cultura denominado meio base (item 4.1) de dez microrganismos. Os microrganismos isolados foram provenientes de várias procedências e previamente isolados por nosso grupo de pesquisa. Os resultados foram avaliados de acordo com as medidas de tensão superficial do meio fermentado livre de células e medidas de CMD^{-1} e CMD^{-2} como descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Na Tabela 10 podemos observar os valores após 72 h de crescimento das dez culturas bacterianas no referido meio de cultura base.

Segundo Kosaric (1990) a efetividade de um surfactante é determinada pela sua habilidade em baixar a tensão superficial, sendo que bons surfactantes são capazes de apresentar um abaixamento em torno de 35 mN/m. Portanto, analisando a Tabela 10, podemos observar que todas as linhagens testadas foram capazes de produzir biosurfactante quando submetidas às condições do ensaio, evidenciando a viabilidade do método de seleção proposto por Carrilo e Mardaraz (1996).

Após a análise dos dados de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} realizou-se um estudo microscópico de coloração de GRAM onde constatou-se que todas os microrganismos em estudo eram GRAM+, exceto o isolado LB006 o qual mostrou ser GRAM-. Estudos da produção biotecnológica de surfactantes vêm sendo realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Alimentos há vários anos, utilizando na maior parte deles linhagens de bactérias GRAM+. Portanto, neste trabalho propôs-se estudar o isolado LB006, pois o mesmo apresentou características bastante relevantes quanto a capacidade de crescimento e produção de biosurfactante no meio base considerado para produção de biosurfactante por linhagens de *Bacillus* sp..

Tabela 10: Produção de Biosurfactante em Meio Base pelos isolados selecionados pelo método descrito por Carrilo e Mardaraz (1996).

Linhagem	Tensão Superficial (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
LB1a	29,67 ± 0,18	35,06 ± 0,20	47,33 ± 0,18
LB2a	26,29 ± 0,04	29,46 ± 0,07	46,75 ± 0,20
LB2b	26,48 ± 0,02	28,81 ± 0,06	35,12 ± 0,16
LB5a	27,80 ± 0,07	30,66 ± 0,13	44,92 ± 0,19
LB5b	38,75 ± 0,20	41,29 ± 0,19	58,70 ± 0,19
LB114	32,59 ± 0,19	36,12 ± 0,19	50,57 ± 0,14
LB115	31,08 ± 0,15	34,60 ± 0,18	58,04 ± 0,19
LB117	30,53 ± 0,10	33,88 ± 0,18	59,57 ± 0,19
LB006	30,36 ± 0,13	49,87 ± 0,19	59,16 ± 0,19
LB74	34,28 ± 0,19	42,40 ± 0,19	58,48 ± 0,20
Meio s/ inóculo	55,65 ± 0,08		

Identificação da linhagem selecionada:

O microrganismo LB006 selecionado para esse estudo foi isolado em meio ágar nutriente a partir de amostras de legumes e verduras provenientes da Central de Abastecimento - CEASA localizado na cidade de Campinas – SP.

Foi preparada uma suspensão da cultura com densidade +2 na escala de Mac Farland seguido de várias diluições para plaqueamento, de forma a se obter colônias isoladas para posterior análise das características morfológicas, conforme apresentado nas Figuras 9 e 10 e de acordo com os dados da Tabela 11.

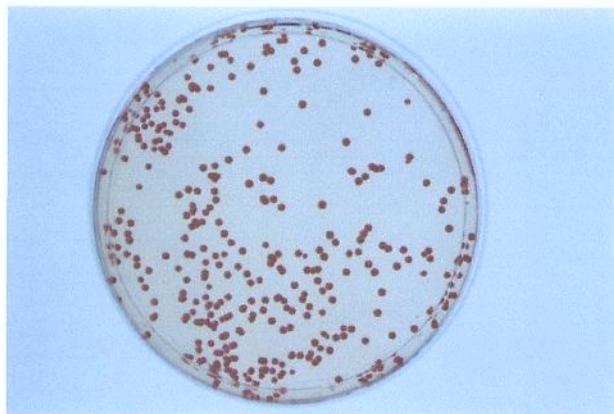


Figura 9: Morfologia das colônias do isolado LB006 após 24 h de incubação a 37°C em ágar nutriente.

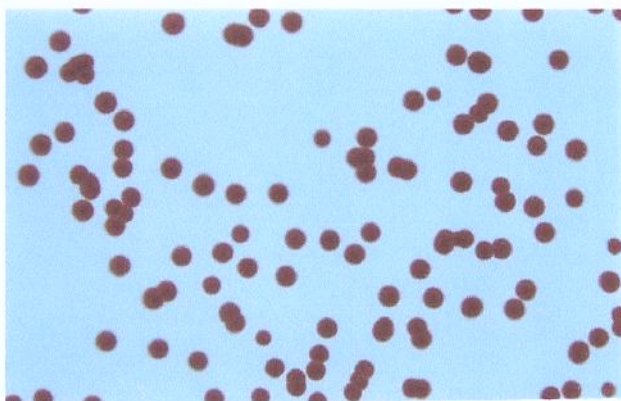


Figura 10: Morfologia das colônias do isolado LB006 após 24 h de incubação a 37°C em ágar nutriente (ampliada).

Tabela 11: Características morfológicas das colônias.

Características das colônias	Isolado LB006
Tamanho	médio
Forma	circular
Elevação	plana
Margem	inteira
Superfície	lisa
Densidade	opaca
Cromogênese	pigmentada
Cor	vermelha
Odor	ausente
Borda	regular
Consistência	butirosa

A coloração de GRAM possibilitou a avaliação das características microscópicas do isolado LB006, as quais são apresentadas na Figura 11, onde pode-se observar a coloração rosada das células o que evidencia uma bactéria GRAM-. Quanto a sua forma, foi possível concluir que tratava-se de um cocobacillus, conforme demonstrado pelo estudo de microscopia eletrônica do microrganismo (Figura 12) utilizando a técnica de varredura.

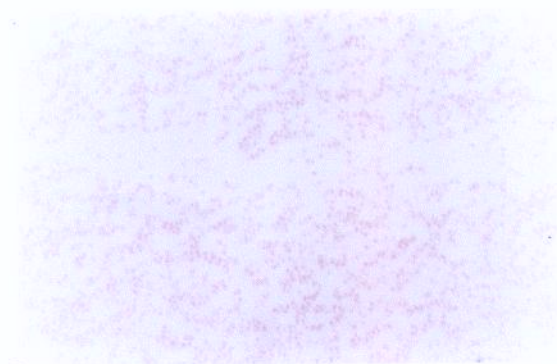


Figura 11: Características microscópicas do isolado LB006 através de coloração de GRAM após 24 h de incubação a 30⁰C em agar nutriente (aumento de 1000x).

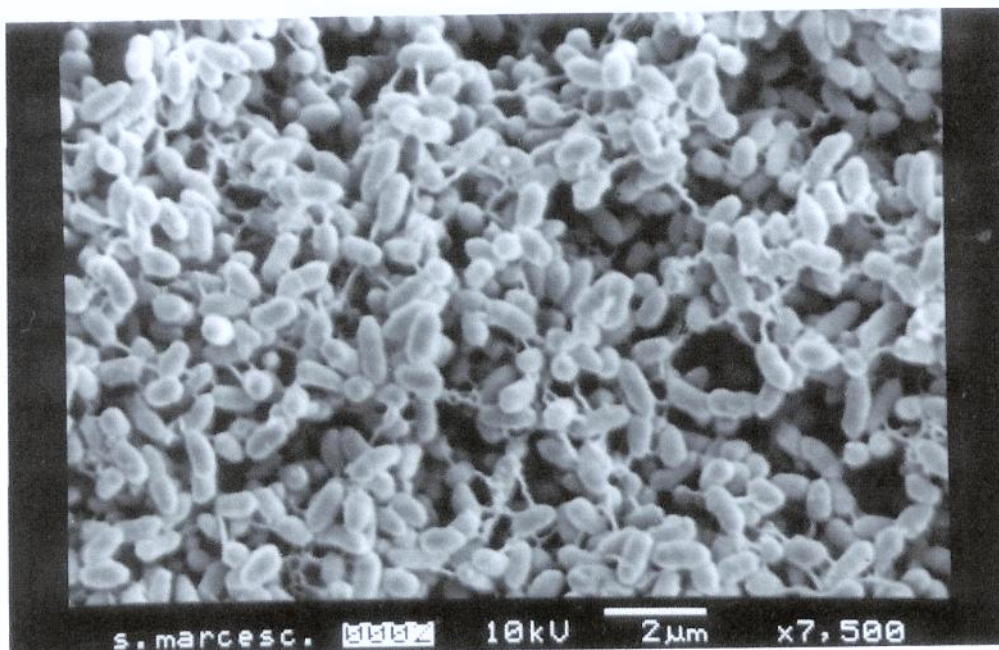


Figura 12: Microscopia eletrônica do isolado LB006 pelo método de varredura.

O microrganismo em estudo foi submetido a diferentes temperaturas de crescimento, como descrito previamente no item 4.5.3.1, o qual apresentou melhor crescimento nas temperaturas de 30 e 37°C no tempo de 24 h. Pouco crescimento foi observado após 48 h quando submetido a 45°C e nenhum crescimento foi evidenciado nas temperaturas de 50 e 55°C. Após a análise dos testes de identificação realizados com base no Manual de Bacteriologia Determinativa, Bergey's (1994), o microrganismo isolado foi identificado como uma bactéria do gênero *Serratia* sp., sendo classificada como enterobactérias e apresentando uma temperatura ótima de crescimento em torno de 35 a 37°C. Devido a isso, o inóculo da cultura para todos os testes seguintes foi preparado a temperatura de 37°C por 24 h.

A avaliação quanto ao requerimento de oxigênio pelo microrganismo selecionado foi realizada de acordo com o procedimento 4.5.3.2, onde observou-se que o mesmo cresceu por todo o meio, mostrando que o requerimento de oxigênio é facultativo, ou seja, trata-se de uma

bactéria aeróbia facultativa, corroborando com as características apresentadas pelo gênero *Serratia* sp.

O teste de osmotolerância teve por objetivo analisar a capacidade da bactéria LB006 em crescer em meios de cultura contendo diversas concentrações de NaCl. Após 24 e 48 h de incubação, a 37°C, foi observado a turvação do meio nos tubos que continham de 2 a 7% de NaCl, quando comparados a um tubo controle contendo apenas meio caldo nutriente e sal nas mesmas condições. No entanto, o crescimento do microrganismo foi completamente inibido quando a concentração de NaCl foi de 10%. Esse teste é extremamente relevante quando se refere a produção de biosurfactante, pois segundo Banat (1995), a recuperação de petróleo nos grandes derramamentos que ocorrem em alto mar é uma das grandes aplicações desses bioprodutos.

Os testes bioquímicos, os quais foram extremamente importantes na identificação do microrganismo em estudo, tiveram como finalidade caracterizar a capacidade do microrganismo em metabolizar alguns compostos, como por exemplo a gelatina, através da produção da enzima gelatinase. Devido a relevância dessa etapa, utilizaram-se duas linhagens padrões de *Serratia marcescens* 0710 e *S. marcescens* 2573 provenientes da Fundação André Tosello, com o objetivo de se comparar os resultados com o isolado LB006. Conforme os dados apresentados na Tabela 12, e tendo-se como base o Manual Bergey's de Identificação, foi possível verificar que as linhagens apresentaram considerável semelhança quanto aos testes bioquímicos. Após a realização desses testes, foi constatado a importância do Kit API 20E (Figura 13) para a identificação do microrganismo em estudo quanto ao gênero. Para a confirmação da espécie foram realizados alguns testes complementares, os quais estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Comparação das características bioquímicas de duas linhagens padrões de *S. marcescens* com o isolado LB006.

Teste\linhagem	LB006	cepa 0710	cepa 2573
Gram	-	-	-
Características	cocobacilus	cocobacilus	cocobacilus
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
ONPG (β -galactosidase)	+	+	+
Arginina	-	-	-
Lisina	+	+	+
Ornitina	+	+	+
Citrato	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Urease	-	-	-
TDA (triptofano desaminase)	-	-	-
Indol	D*	D*	D*
VP	D*	+	D*
VM	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Glicose	+	+	+
Lactose	+	D*	D*
Manitol	+	+	+
Inositol	+	+	D*
Sorbitol	+	+	+
Ramnose	-	D*	-
Rafinose	-	-	-
Sacarose	+	+	+
Melobiose	+	+	+
Amigdalina	+	+	+
Arabinose	-	-	+
Celobiose	-	-	-
Inositol	+	+	+

D* = resultado não conclusivo.



Figura 13: Kit API 20E inoculado com uma suspensão do isolado LB006 com densidade +0,5 na escala de Mac Farland e incubado a 37 °C por 24 h.

Após a análise dos resultados referentes aos testes de identificação para o isolado LB006, o microrganismo foi identificado como *Serratia marcescens*.

S. marcescens é uma enterobactéria e caracteriza-se pela alta produtividade (5 g/L.h), elevada razão de crescimento, baixo requerimento de nutrientes e baixo consumo de oxigênio (Förster *et al.*, 1996). Geralmente é encontrada em água, solo, plantas, insetos e vertebrados (Grimont & Grimont, 1978), e possui várias características notáveis. É considerada um patógeno oportunista em humanos e representa uma real ameaça em ambientes hospitalares. A produção de pigmento vermelho, prodigiosina, é bastante característica da espécie, estando ligado a secreção principalmente de exoenzimas chaves, tais como nuclease, protease, lipase e quitinase. Alguns estudos mostram que a produção de pigmento pode estar relacionada com a liberação de vesículas extracelulares na superfície da célula. Os aminolipídios (biosurfactante), os quais são produzidos em paralelo com a formação de vesículas, são identificados como agentes umectantes e sua função primária está relacionada com a incorporação desses à membrana lipídica, modificando a flexibilidade ou hidrofobicidade da superfície celular (Matsuyama *et al.*, 1986a).

Curva de crescimento e padronização do inóculo

Após a realização da curva de crescimento da linhagem LB006 conforme descrito no item 4.6, foi possível construir o gráfico apresentado na Figura 14, onde pode-se observar que em aproximadamente 9 h de crescimento ocorreu o início da fase estacionária. Na fase estacionária o microrganismo apresentou uma concentração de 10^9 UFC/mL e uma densidade ótica, a 610 nm, de 0,25. O inóculo usado nos experimentos de otimização da produção do biosurfactante por esta linhagem foi então padronizado em 5 mL de uma cultura contendo 10^9 UFC/mL.

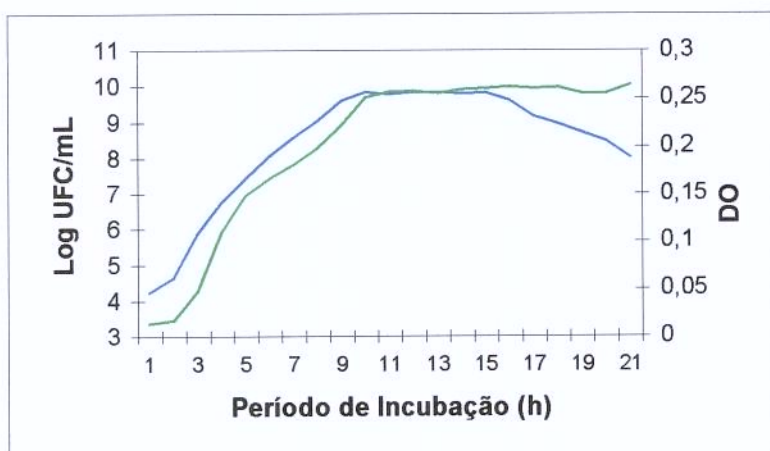


Figura 14: Curva de crescimento de *Serratia marcescens* LB006 em meio caldo nutriente a 30 °C e 120 rpm; Log UFC/mL(—) e Densidade ótica a 610 nm (—).

Seleção do meio de produção de biosurfactante pela linhagem LB006

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} de diferentes meios fermentados pela linhagem de *S. marcescens* LB006. Pode-se observar que a produção de biosurfactante no Meio 1 mostrou-se melhor quando comparado aos resultados de tensão superficial obtidos por Matsuyama *et al.* (1986a) para as linhagens de *S. marcescens* NS38 e NS25, os quais foram de $32,2 \pm 0,1$ e $33,0 \pm 0,2$ mN/m, respectivamente. Para tanto, o Meio 1 foi usado no prosseguimento do estudo de otimização da produção. O Meio 1 apesar de não apresentar um custo baixo, as concentrações dos nutrientes são pequenas e ao final apresenta um custo menor que o Meio Base. Além disso, o Meio 1 é descrito na literatura como apropriado para a produção de biosurfactante pelas linhagens de *S.*

marcescens, sendo o Meio Base utilizado para produção de surfactina pelas linhagens de *Bacillus subtilis* (Santos, 2001).

Tabela 13: Resultados de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} da linhagem LB006 em diferentes meios de produção

Meio de produção	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	CMD^{-1} (mN/m)	CMD^{-2} (mN/m)
Meio 1	$59,83 \pm 0,17$	$29,57 \pm 0,10$	$41,77 \pm 0,19$	$68,92 \pm 0,18$
Meio 2	$68,05 \pm 0,20$	$35,27 \pm 0,19$	$71,25 \pm 0,08$	$73,24 \pm 0,02$
Meio 3	$55,24 \pm 0,19$	$38,71 \pm 0,19$	$70,92 \pm 0,09$	$73,20 \pm 0,04$
Meio 4	$57,52 \pm 0,20$	$42,89 \pm 0,20$	$68,02 \pm 0,18$	$73,08 \pm 0,02$
Meio Base	$55,65 \pm 0,08$	$30,36 \pm 0,13$	$49,87 \pm 0,19$	$59,16 \pm 0,19$

Planejamento experimental:

Para otimização de um processo utilizando a ferramenta estatística do planejamento experimental é necessário se ter uma idéia inicial dos níveis das variáveis que serão estudadas. Para isso, foram realizados experimentos univariáveis para se determinar os níveis que seriam avaliados no planejamento para as variáveis temperatura e pH. Os resultados encontrados nesse estudo univariável estão apresentados nas Tabelas 14 e 15 para temperatura e pH, respectivamente.

Tabela 14: Determinação da temperatura ótima para produção de biosurfactante por *S. marcescens* LB006

Temperatura (°C)	Tensão Superficial (mN/m)	CMD^{-1} (mN/m)	CMD^{-2} (mN/m)
20	$32,36 \pm 0,18$	$48,36 \pm 0,19$	$72,20 \pm 0,16$
25	$31,66 \pm 0,17$	$45,25 \pm 0,19$	$66,73 \pm 0,19$
30	$30,58 \pm 0,14$	$43,97 \pm 0,19$	$69,26 \pm 0,18$
35	$30,27 \pm 0,12$	$42,77 \pm 0,20$	$64,80 \pm 0,19$
40	$49,79 \pm 0,19$	$66,46 \pm 0,19$	$70,44 \pm 0,04$
45	$49,40 \pm 0,20$	$68,08 \pm 0,20$	$72,12 \pm 0,01$

Tabela 15: Determinação do pH ótimo para produção de biosurfactante por *S. marcescens* LB006

pH	Tensão Superficial (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
3,0	56,94 ± 0,13	61,71 ± 0,18	72,63 ± 0,12
4,0	31,91 ± 0,17	53,19 ± 0,33	73,28 ± 0,01
5,0	30,70 ± 0,19	51,27 ± 0,33	73,01 ± 0,02
5,5	30,74 ± 0,20	47,29 ± 0,23	72,94 ± 0,03
6,0	31,12 ± 0,17	49,76 ± 0,40	65,06 ± 0,02
6,5	30,94 ± 0,12	42,22 ± 0,19	63,04 ± 0,01
7,0	30,22 ± 0,19	42,64 ± 0,35	63,53 ± 0,01
7,5	30,11 ± 0,18	43,21 ± 0,21	64,45 ± 0,03
8,0	31,07 ± 0,17	44,09 ± 0,31	70,96 ± 0,10
8,5	31,60 ± 0,19	53,37 ± 0,34	73,01 ± 0,06
9,0	31,80 ± 0,19	54,55 ± 0,20	73,05 ± 0,01
10,0	31,97 ± 0,19	53,84 ± 0,30	72,74 ± 0,12
11,0	32,72 ± 0,18	52,20 ± 0,29	71,83 ± 0,14
12,0	56,04 ± 0,19	72,25 ± 0,03	72,67 ± 0,02

Analisando as tensões superficiais e medidas das CMDs dos meios fermentados apresentados nas Tabelas 13 e 14 quando comparados à tensão superficial do meio sem inóculo de $59,83 \pm 0,17$ mN/m, verifica-se que houve a produção de compostos com atividade surfactante pelo microrganismo em estudo. Após a avaliação dos resultados da linhagem LB006 submetida a diferentes temperaturas de incubação (Tabela 14), ficou constatado que a faixa ótima para a produção do biosurfactante foi de 25 a 35 °C.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 15, verifica-se uma baixa produção de biosurfactante nos valores extremos de pH testados e a faixa ótima encontra-se entre 5,5 e 8,0.

Planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais

A porcentagem de abaixamento da tensão superficial do meio fermentado em relação ao meio sem inóculo foi usada como resposta para avaliar os efeitos das variáveis nesse planejamento. Foram coletadas amostras após 24, 48 e 72 h de incubação com o objetivo de se encontrar o tempo necessário para atingir o equilíbrio dos ensaios. Os resultados encontrados estão apresentados nas Tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 24 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de Abaixamento da Tensão Superficial
1	57,54 ± 0,19	37,02 ± 0,20	35,66
2	52,66 ± 0,19	35,61 ± 0,20	32,37
3	60,13 ± 0,20	41,77 ± 0,20	30,53
4	58,30 ± 0,19	37,62 ± 0,19	35,47
5	57,43 ± 0,16	40,30 ± 0,19	29,82
6	52,96 ± 0,18	37,81 ± 0,20	28,60
7	59,43 ± 0,19	38,71 ± 0,19	34,86
8	55,49 ± 0,18	36,21 ± 0,19	34,74
9	53,08 ± 0,20	39,20 ± 0,20	26,14
10	53,08 ± 0,20	39,04 ± 0,19	26,45
11	53,08 ± 0,20	39,25 ± 0,19	26,05
12	53,08 ± 0,20	39,16 ± 0,20	26,22

Tabela 17: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 48 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	57,54 $\pm$ 0,19	38,94 $\pm$ 0,20	32,32
2	52,66 $\pm$ 0,19	40,75 $\pm$ 0,20	22,61
3	60,13 $\pm$ 0,20	39,69 $\pm$ 0,19	33,99
4	58,30 $\pm$ 0,19	40,63 $\pm$ 0,20	30,30
5	57,43 $\pm$ 0,16	39,24 $\pm$ 0,19	31,67
6	52,96 $\pm$ 0,18	35,42 $\pm$ 0,18	33,11
7	59,43 $\pm$ 0,19	36,78 $\pm$ 0,19	38,11
8	55,49 $\pm$ 0,18	36,00 $\pm$ 0,20	35,12
9	53,08 $\pm$ 0,20	36,16 $\pm$ 0,19	31,87
10	53,08 $\pm$ 0,20	36,37 $\pm$ 0,19	31,48
11	53,08 $\pm$ 0,20	36,24 $\pm$ 0,19	31,72
12	53,08 $\pm$ 0,20	36,40 $\pm$ 0,19	31,42

Tabela 18: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 72 h de fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com pontos centrais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	57,54 ± 0,19	36,42 ± 0,20	36,70
2	52,66 ± 0,19	39,71 ± 0,20	24,59
3	60,13 ± 0,20	39,64 ± 0,19	34,07
4	58,30 ± 0,19	35,30 ± 0,19	39,45
5	57,43 ± 0,16	37,44 ± 0,19	34,80
6	52,96 ± 0,18	31,05 ± 0,09	41,37
7	59,43 ± 0,19	37,55 ± 0,19	36,81
8	55,49 ± 0,18	29,70 ± 0,05	46,47
9	53,08 ± 0,20	37,16 ± 0,19	29,99
10	53,08 ± 0,20	38,37 ± 0,19	27,71
11	53,08 ± 0,20	37,24 ± 0,19	29,84
12	53,08 ± 0,20	37,40 ± 0,19	29,54

Os ensaios 9, 10, 11 e 12 representam os pontos centrais do planejamento, sendo que três deles apresentaram boa reprodutibilidade dos resultados, portanto somente esses pontos foram usados para a análise da influência das variáveis.

De acordo com os dados apresentados nas tabelas anteriores, verifica-se que os maiores valores de abaixamento da tensão superficial foram alcançados no tempo de 72 h, sendo esses então utilizados para a análise do planejamento (Tabelas 19 e 20).

Os valores encontrados para as variáveis estudadas nesse primeiro planejamento foram obtidos através do software STATISTICA versão 5.0. Todos os fatores foram considerados significativos a um nível de confiança de 95%. Porém, o efeito negativo encontrado para a variável peptona (Tabela 20) demonstra que a influência positiva da mesma na produção do biosurfactante é maior quando está em um nível inferior de concentração, indicando que com a redução da concentração de peptona no meio pode-se aumentar a produção de biosurfactante. Os valores encontrados para as demais variáveis indicam que o aumento da concentração das mesmas no meio produziu um efeito positivo na resposta.

Através do planejamento fatorial fracionário foi possível verificar quais foram as variáveis significativas, servindo como base para o planejamento fatorial completo.

O microrganismo em estudo trata-se de uma linhagem de *Serratia marcescens*, a qual é classificada como enterobactéria. As condições ideais apresentadas na literatura para essa classe de bactérias são temperatura ótima de crescimento em torno de 37°C e pH próximo à neutralidade. Com base nesses dados e nos resultados encontrados para essas variáveis no primeiro planejamento, no estudo seguinte da otimização foram consideradas apenas as variáveis peptona e glicerol, mantendo-se fixas a temperatura em 35°C e o pH igual a 7,0.

Tabela 19: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Ensaio	Temperatura	pH _{inicial}	Glicerol	Peptona	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	-1	-1	-1	-1	36,70
2	+1	-1	-1	+1	24,59
3	-1	+1	-1	+1	34,07
4	+1	+1	-1	-1	39,45
5	-1	-1	+1	+1	34,80
6	+1	-1	+1	-1	41,37
7	-1	+1	+1	-1	36,81
8	+1	+1	+1	+1	46,47
9	0	0	0	0	29,99
10	0	0	0	0	29,84
11	0	0	0	0	29,54

Tabela 20: Efeitos das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Fatores	Efeitos
Principais interações	34,875
Temperatura	2,375
pH	4,835
Glicerol	6,160
Peptona	-3,600

Planejamento fatorial completo 2² com pontos centrais e axiais

Nesse planejamento foram estudadas as concentrações dos componentes do meio e conseqüentemente otimização do processo de produção de biosurfactante pela linhagem *S. marcescens* LB006.

As amostras foram coletadas após 48, 72 e 96 h de incubação e a resposta foi avaliada de acordo com a porcentagem de abaixamento da tensão superficial do meio fermentado em cada ensaio em relação ao mesmo meio sem inóculo (Tabelas 21, 22 e 23).

Tabela 21: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 48 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2² com pontos centrais e axiais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	61,86 ± 0,31	31,22 ± 0,18	49,53
2	67,72 ± 0,20	32,78 ± 0,18	51,59
3	56,40 ± 0,35	31,99 ± 0,17	43,28
4	61,62 ± 0,19	32,19 ± 0,19	47,76
5	66,35 ± 0,19	33,12 ± 0,15	50,08
6	58,99 ± 0,21	31,98 ± 0,16	45,78
7	59,08 ± 0,26	32,65 ± 0,18	44,73
8	61,90 ± 0,19	32,78 ± 0,19	47,04
9	62,33 ± 0,16	32,18 ± 0,19	48,37
10	62,33 ± 0,16	32,14 ± 0,18	48,43
11	62,33 ± 0,16	32,28 ± 0,18	48,21
12	61,86 ± 0,31	31,22 ± 0,18	49,53

Tabela 22: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 72 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	61,86 ± 0,31	32,64 ± 0,13	47,23
2	67,72 ± 0,20	32,70 ± 0,16	51,71
3	56,40 ± 0,35	32,17 ± 0,19	42,96
4	61,62 ± 0,19	30,60 ± 0,12	50,34
5	66,35 ± 0,19	36,29 ± 0,20	45,30
6	58,99 ± 0,21	29,98 ± 0,14	49,17
7	59,08 ± 0,26	31,89 ± 0,18	46,02
8	61,90 ± 0,19	30,89 ± 0,15	50,09
9	62,33 ± 0,16	30,62 ± 0,19	50,87
10	62,33 ± 0,16	30,75 ± 0,16	50,66
11	62,33 ± 0,16	30,71 ± 0,10	50,72
12	61,86 ± 0,31	32,64 ± 0,13	47,23

Tabela 23: Porcentagem de abaixamento da tensão superficial após 96 h de fermentação para o planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais.

Ensaio	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	Porcentagem de abaixamento da Tensão Superficial
1	61,86 ± 0,31	32,25 ± 0,18	47,86
2	67,72 ± 0,20	33,63 ± 0,09	50,33
3	56,40 ± 0,35	33,07 ± 0,16	41,36
4	61,62 ± 0,19	30,56 ± 0,18	50,40
5	66,35 ± 0,19	36,67 ± 0,19	44,73
6	58,99 ± 0,21	29,36 ± 0,19	50,22
7	59,08 ± 0,26	31,93 ± 0,19	45,95
8	61,90 ± 0,19	30,47 ± 0,19	50,77
9	62,33 ± 0,16	31,33 ± 0,12	49,73
10	62,33 ± 0,16	31,67 ± 0,12	49,18
11	62,33 ± 0,16	31,60 ± 0,18	49,30
12	61,86 ± 0,31	32,25 ± 0,18	47,86

Analisando os dados da Tabela 21 verifica-se que em 48 h houve uma considerável produção de biosurfactante. No entanto, os abaixamentos máximos da tensão superficial foram encontrados após 72 h de incubação, sendo esses praticamente mantidos no tempo de 96 h (Tabela 23). Portanto, os valores apresentados na Tabela 22 foram usados como resposta para avaliação do planejamento através do software STATISTICA. Os valores encontrados para os pontos centrais foram bastante próximos, demonstrando a boa reprodutibilidade do experimento, exceto para o ensaio número 12, o qual foi excluído na análise do planejamento. Os ensaios 5 a 8 representam os pontos axiais das variáveis peptona e glicerol.

As Tabelas 24, 25 e 26 demonstram os valores obtidos na análise do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais através do software STATISTICA com um nível de confiança de 95%. Embora os valores apresentados nos ensaios 9, 10 e 11, os quais representam os pontos centrais, não sejam os maiores valores, esses encontram-se bastante próximos do maior valor de abaixamento da tensão superficial (51,71 – ensaio 2). Isto mostra que o objetivo de otimizar a produção de biosurfactante pela linhagem LB006 foi atingido.

Tabela 24: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

Ensaio	Glicerol	Peptona	% abaixam.TS
1	-1	-1	47,23
2	+1	-1	51,71
3	-1	+1	42,96
4	+1	+1	50,34
5	0	-1,41	45,30
6	0	+1,41	49,17
7	-1,41	0	46,02
8	+1,41	0	50,09
9	0	0	50,87
10	0	0	50,66
11	0	0	50,72

Tabela 25: Efeito das variáveis do planejamento fatorial completo 2²

Fatores	Efeitos
Principais interações	50,748
(1) Glicerol (L)	4,412
Glicerol (Q)	-2,491
(2) Peptona (L)*	-0,045
Peptona (Q)	-3,316
(1) e (2)	1,450
* fator não significativo	$R^2 = 74,54\%$

Tabela 26: Coeficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2² considerando apenas os valores significativos no limite de confiança de 95%.

Fatores	Coeficiente de regressão
Principais interações	50,748
(1) Glicerol (L)	2,206
Glicerol (Q)	-1,245
Peptona (Q)	-1,658
(1) e (2)	0,725
$R^2 = 74,54\%$	

O coeficiente de regressão (Tabela 26) forneceu o modelo matemático abaixo, sendo que o R^2 teve um valor aceitável indicando bom ajuste do modelo, ou seja, mais de 70% das variações são explicadas pelo modelo. Para a construção da equação matemática foram considerados apenas os fatores significativos.

Equação 1: Modelo matemático codificado

$$Y_{\text{codificado}} = 50,748 + 2,206 x_1 - 1,245 x_1^2 - 1,658 x_2^2 + 0,725 x_1 x_2$$

Tabela 27: Análise de variância do planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de biosurfactante pela linhagem LB006.

	Soma Quadrática	Graus Liberdade	Média Quadrát.	F _{calculado}
Regressão	59,892	4	14,973	4,50
Resíduo	20,456	6	3,400	
Falta de ajuste	20,432	4		
Erro puro	0,0234	2		
TOTAL	80,348	16		

F_{tabelado} = 4,53

R² = 74,54 %

R = 0,5456

O valor de F_{calculado} foi aproximadamente igual ao valor de F_{tabelado} (Tabela 27), indicando que o modelo matemático é válido.

As Figuras 15 e 16 mostram os gráficos de superfície de resposta e de superfície de contorno das variáveis estudadas nesse planejamento, onde a cor vermelha mais escura representa as faixas ótimas para produção do biosurfactante. Analisando-se esses dados, constatou-se que as faixas ótimas encontram-se entre 0,17 e 0,4% para peptona e entre 2,0 e aproximadamente 3,14% para o glicerol. Porém, para o prosseguimento dos estudos utilizaremos o ponto central dessa faixa ótima, o qual foi determinado em 0,25% de peptona e 3% de glicerol.

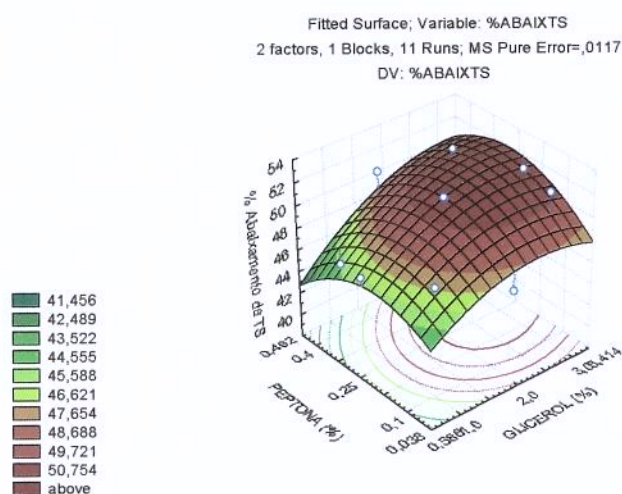


Figura 15: Superfície de resposta

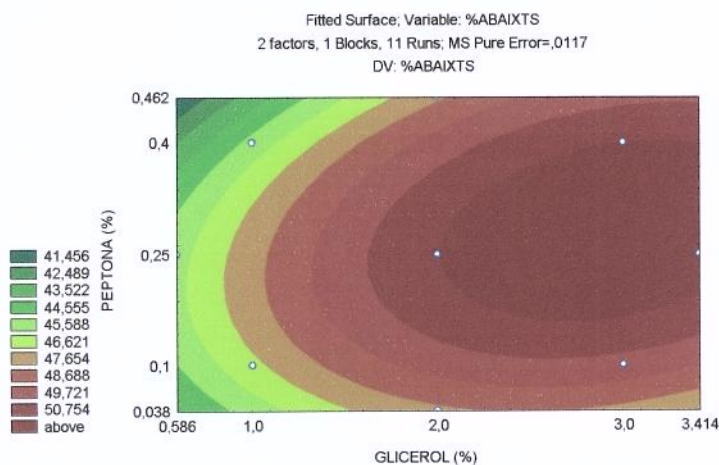


Figura 16: Superfície de contorno

Após o término dessa etapa, verificou-se que a ferramenta estatística do planejamento fatorial foi de grande valia para a otimização da produção de surfactante pelo microrganismo em estudo, onde foi alcançada a otimização do processo.

Estudos utilizando ferramentas estatísticas têm sido realizados para a otimização de componentes de meio de cultura para a produção de riboflavina por *Eremothecium ashbyii* (Pujari e Chandra, 2000). Sem (1997) empregou a análise de superfície de resposta para otimizar o meio de cultura para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* DSM 3256. No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem estudos semelhantes a esse usando linhagens de mesma espécie e tipo de biosurfactante.

Curva de produção do biosurfactante

Após a otimização do meio de produção realizou-se uma cinética de produção versus tempo, número de células viáveis e índice de emulsificação, com o objetivo de se determinar qual o tempo exato para maior produção do biosurfactante. Também foi determinado o valor da CMC^{-1} e avaliado a capacidade emulsificante do biosurfactante em estudo.

Através dos dados obtidos foi possível construir o gráfico apresentado na Figura 17, onde se verifica a presença do biosurfactante no primeiro ponto de 6 h de fermentação. Após 96 h ocorre a diminuição dos componentes com atividade superficial no meio, o que também foi observado por Pruthi e Cameotra (1997) quando estudaram a cinética de produção de

biosurfactante por uma linhagem de *S. marcescens* em meio contendo glicose como fonte de carbono, onde após 36 h de produção ocorreu uma queda brusca da atividade do biosurfactante. Através do gráfico mostrado na Figura 17 podemos observar que a máxima produção do biosurfactante é alcançada ao final da fase estacionária de crescimento do microrganismo. Essa mesma relação foi também observada por Pruthi e Cameotra (2000), sugerindo que o biosurfactante foi produzido como um metabólico secundário pela linhagem de *S. marcescens* MTCC 86.

Na Figura 18 estão apresentados os dados relacionados à atividade emulsificante (procedimento descrito no item 4.13) do biosurfactante presente no meio de cultura, onde foram testados óleo de soja, querosene e hexadecano. Podemos constatar que o biosurfactante mostrou boa atividade emulsificante frente ao óleo de soja. Porém, as quantidades de biosurfactante encontradas no meio após 6, 12 e 144 h de fermentação não foram suficientes para emulsionar o hexadecano. O índice de emulsificação de aproximadamente 50% para o querosene pode ser comparado ao valor de 40% encontrado por Abu-Ruwaida *et al.* (1991). Por outro lado, Pruthi e Cameotra (2000) calcularam o valor de E_{24} de outra maneira e verificaram que o biosurfactante de *S. marcescens* MTCC86 foi capaz de emulsionar 100% do mesmo hidrocarboneto. No entanto, nenhuma formação de emulsão foi observada com querosene e hexadecano nas amostras cujo tempo de fermentação foram de 6 e 12 h.

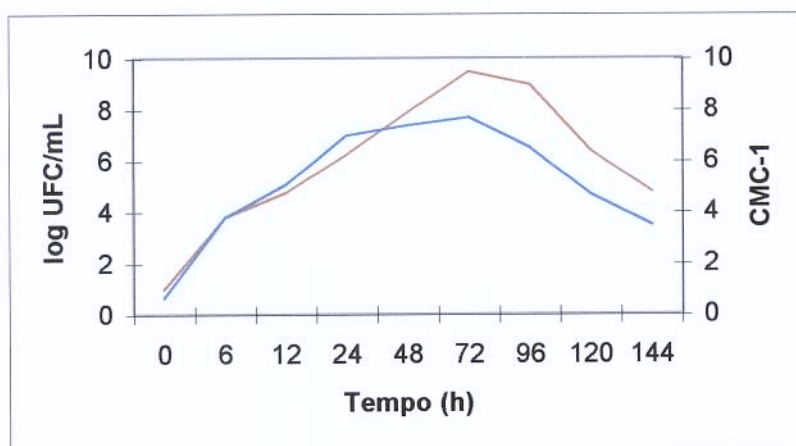


Figura 17: Cinética de Produção de Biosurfactante por *S. marcescens* LB006; UFC/mL (—), CMC⁻¹ (—)

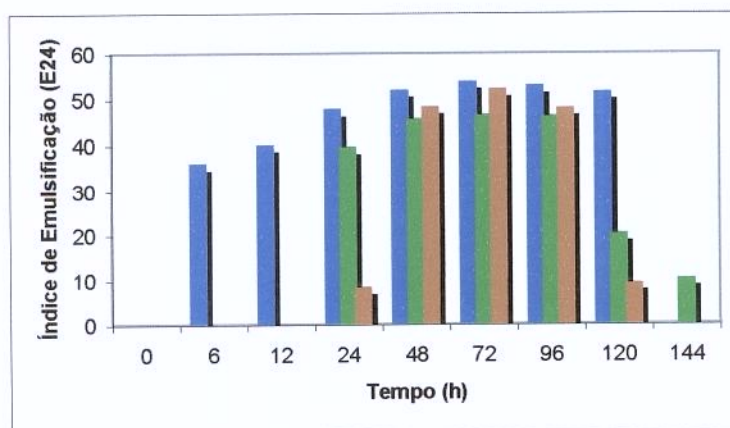


Figura 18: Índice de Emulsificação (E₂₄) de óleo de soja (●), Querosene (●) e hexadecano (●) pelo biosurfactante produzido.



Figura 19: Atividade emulsificante do biosurfactante bruto (solução 0,35%)

1a: querosene/H₂O

1b: querosene/biosurfactante

2a: hexadecano/H₂O

2b: hexadecano/biosurfactante

3a: óleo de soja/H₂O

3b: óleo de soja/biosurfactante

Influência de compostos hidrofóbicos na produção do biosurfactante

Uma série de estudos descritos na literatura revelam que a produção de surfactante por microrganismos pode ser estimulada quando na presença de compostos hidrofóbicos no meio de produção. Após a análise dos resultados obtidos para CMD⁻² apresentados na Tabela 28, constatou-se que a presença de óleos vegetais influenciaram positivamente a produção de biosurfactante no meio. Porém, a maior diferença foi observada em relação a presença do óleo de girassol. Devido a isso, e sabendo-se que o mesmo é composto de aproximadamente 60% de ácido linoleico, testou-se a adição desse último no meio de produção, confirmando sua potencial influência. O decréscimo na tensão superficial foi de 64,54 para 28,39 mN/m para o meio fermentado livre de células, atingindo valores de CMD⁻¹ e CMD⁻² de 29,72 e 37,97

mN/m, respectivamente, sugerindo que o ácido linoleico foi possivelmente o responsável pela estimulação da produção do biosurfactante quando o meio de produção foi suplementado com óleo de girassol.

No entanto, a presença de hidrocarbonetos não representou uma influência muito significativa na produção de surfactante pela linhagem LB006, conforme observa-se na Tabela 28. Mercade e Manresa (1994) verificaram a produção de rhamnolipídio por *Pseudomonas* sp. JAMM na presença de óleo de oliva e milho e de alcanos, onde o abaixamento máximo da tensão superficial (aproximadamente 30 mN/m) foi alcançado após 45 h de fermentação, mantendo-se constante até 144 h com óleo de oliva. A presença de hidrocarbonetos no meio de produção foi extremamente relevante, pois rendimentos de aproximadamente 12 g/L foram apresentados pelos autores quando o microrganismo foi inoculado com η -alcanos. Contudo, observando-se os valores apresentados na Tabela 29 para CMD⁻², constata-se que as menores medidas foram obtidas no meio contendo petróleo e hidrocarbonetos com cadeia carbônica acima de 14 carbonos. Isto evidencia então, que a produção de surfactante pela linhagem em estudo foi estimulada pela presença de compostos insolúveis no meio, tanto de óleos vegetais como de hidrocarbonetos de cadeia longa.

Tabela 28: Influência de óleos vegetais na produção do biosurfactante.

Óleo	Tensão Superficial (mN/m) do meio sem inóculo	Tensão Superficial (mN/m) do meio com inóculo	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
Meio sem óleo	60,47 $\pm$ 0,03	30,65 $\pm$ 0,10	40,98 $\pm$ 0,20	67,54 $\pm$ 0,16
Soja	52,87 $\pm$ 0,11	30,25 $\pm$ 0,18	41,52 $\pm$ 0,19	53,96 $\pm$ 0,20
Gordura de coco	52,09 $\pm$ 0,16	30,90 $\pm$ 0,20	42,12 $\pm$ 0,19	54,90 $\pm$ 0,19
Mamona	53,98 $\pm$ 0,04	30,41 $\pm$ 0,12	43,36 $\pm$ 0,20	56,11 $\pm$ 0,19
Milho	54,01 $\pm$ 0,02	30,52 $\pm$ 0,18	43,49 $\pm$ 0,20	54,42 $\pm$ 0,20
Oliva	52,00 $\pm$ 0,10	30,19 $\pm$ 0,13	40,08 $\pm$ 0,20	52,17 $\pm$ 0,07
Girassol	52,47 $\pm$ 0,12	29,90 $\pm$ 0,10	35,97 $\pm$ 0,19	50,90 $\pm$ 0,20

Tabela 29: Influência da adição de petróleo e de hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia na produção do biosurfactante.

Hidrocarboneto	Tensão Superficial	Tensão Superficial	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
	(mN/m) do meio sem inóculo	(mN/m) do meio com inóculo		
Meio sem HC	61,01 ± 0,03	30,23 ± 0,10	41,04 ± 0,19	67,10 ± 0,13
Petróleo	56,31 ± 0,19	30,22 ± 0,14	40,61 ± 0,19	54,34 ± 0,19
C ₁₀ H ₂₂	51,83 ± 0,20	31,64 ± 0,19	43,02 ± 0,19	66,67 ± 0,02
C ₁₄ H ₃₀	51,67 ± 0,19	31,29 ± 0,14	41,60 ± 0,20	61,97 ± 0,01
C ₁₆ H ₃₄	52,87 ± 0,12	30,34 ± 0,19	40,03 ± 0,19	60,80 ± 0,02
C ₁₈ H ₃₈	51,34 ± 0,16	29,86 ± 0,15	40,01 ± 0,19	59,75 ± 0,04
C ₂₀ H ₄₂	55,92 ± 0,17	29,94 ± 0,18	39,87 ± 0,20	59,56 ± 0,02
C ₂₈ H ₅₈	54,80 ± 0,19	29,93 ± 0,19	40,14 ± 0,17	60,05 ± 0,01

Produção de biosurfactante por S. marcescens LB006 em resíduos industriais

Embora os biosurfactantes apresentem inúmeras vantagens sobre os surfactantes sintetizados quimicamente, sua produção ainda não é economicamente competitiva em relação aos sintéticos. Contudo, diferentes caminhos podem ser seguidos no intuito de reduzir os custos da produção, um deles é o uso de resíduos industriais com baixo ou nenhum custo para o desenvolvimento do microrganismo e produção de biosurfactante. Nessa etapa, foi testado a produção de biosurfactante inoculando-se a linhagem de *S. marcescens* LB006 em resíduos provenientes de diferentes fontes (item 4.12) e as medidas de tensão superficial, CMD⁻¹ e CMD⁻² são apresentadas na Tabela 30. Os valores encontrados demonstram que o microrganismo em estudo foi plenamente capaz de produzir surfactante nos meios denominados RPB1 e RPB2, ambos com aproximadamente 3 e 10% de gordura, evidenciando mais uma vez a capacidade da linhagem em ser estimulada por compostos hidrofóbicos quanto a produção de surfactante. Nos demais resíduos a mesma demonstrou pouca ou nenhuma produção do biosurfactante, como por exemplo, no meio de melaço (contendo aproximadamente 3% sólidos solúveis) onde a diferença de 1,62 entre as medidas de tensão superficial entre o meio sem inóculo e o meio contendo a cultura é desprezível. Ao contrário dos resultados encontrados por Makkar e Cameotra (1997) para a produção de biosurfactante

por *Bacillus subtilis* MTCC 2423 em meio contendo sais e 2% de melaço, as medidas em torno de 30 mN/m foram encontradas para tensão superficial e CMD^{-1} . No entanto, a manipueira, resíduo proveniente da produção de farinha de mandioca, tem sido usada como substrato para produção de biosurfactante por linhagens de *Bacillus* sp. obtendo-se excelentes resultados (Ferraz et al., 2001).

Tabela 30: Produção de biosurfactante por *S. marcescens* LB006 em resíduos industriais.

Meio de Produção	Tensão Superficial	Tensão Superficial	CMD^{-1} (mN/m)	CMD^{-2} (mN/m)
	(mN/m) do meio sem inóculo	(mN/m) do meio com inóculo		
Manipueira	46,68 ± 0,19	35,06 ± 0,20	63,02 ± 0,12	72,25 ± 0,05
Melaço	41,74 ± 0,18	40,12 ± 0,20	68,91 ± 0,03	72,92 ± 0,01
Soro de leite	49,00 ± 0,01	42,34 ± 0,12	69,43 ± 0,18	72,63 ± 0,02
RPB 1	45,89 ± 0,19	29,23 ± 0,18	40,58 ± 0,18	51,09 ± 0,01
RPB 2	44,50 ± 0,20	30,63 ± 0,18	41,05 ± 0,20	53,44 ± 0,02

Determinação do efeito da temperatura e do pH e na estabilidade do biosurfactante produzido

Após submetido o meio fermentado livre de células a diferentes temperaturas e pHs, conforme descrito nos itens 4.2.14 e 4.2.15, respectivamente, mediu-se a tensão superficial das amostras antes (30,13 mN/m ± 0,12) e depois do tratamento, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 31 e 32. Pode-se observar que o biosurfactante produzido foi bastante estável em relação aos dois efeitos avaliados, sendo notada uma pequena mudança na medida da tensão superficial nos pHs extremos e nas temperaturas acima de 90°C. Resultados semelhantes foram observados por Abu-Ruwaida *et al.* (1991) onde variações significativas de tensão superficial não foram constatadas quando o biosurfactante de *Thielavia terrestris* foi submetido aos mesmos valores de pH. O mesmo também apresentou alta estabilidade quando exposto a temperaturas de 100 e 120°C por 15 minutos, atingindo valores de 31,8 e 30,50 mN/m para tensão superficial, respectivamente.

Tabela 31: Efeito do pH na estabilidade do biosurfactante produzido.

pH	Tensão Superficial (mN/m)
2,0	31,28 ± 0,16
4,0	30,13 ± 0,19
6,0	30,02 ± 0,19
8,0	30,71 ± 0,18
10,0	31,99 ± 0,19
12,0	36,08 ± 0,18

Tabela 32: Influência da temperatura na estabilidade do biosurfactante produzido.

Temperatura (°C)	Tensão Superficial (mN/m)
10	30,17 ± 0,19
30	30,42 ± 0,18
40	30,02 ± 0,19
60	30,12 ± 0,18
90	33,46 ± 0,19
120	35,46 ± 0,18

Aplicação do biosurfactante produzido

Atavés do processo de recuperação do biosurfactante realizado como descrito no item 4.2.16, tornou-se possível calcular o rendimento de 4 g/L do produto bruto. Esse rendimento encontra-se bastante próximo do apresentado por Pruthi e Cameotra (2000), o qual foi de 5,68 g/L quando o biosurfactante, produzido por *S. marcescens* MTCC86, foi recuperado através da precipitação do composto bruto com acetona gelada. O método descrito pelos autores para recuperação com acetona foi testado para recuperação do biosurfactante em estudo, atingindo-se um rendimento de apenas 2,2 g/L.

Após obtido o biosurfactante bruto, foi possível testar a aplicação do mesmo quanto a influência na atividade da enzima lipase de *Rhizopus* sp.

Influência da adição do biosurfactante na atividade da lipase em diferentes substratos

A degradação de gordura em processos de tratamento de resíduos é considerada uma pré etapa importante, a qual facilita e diminui os custos do tratamento. Para tanto, inicialmente

observou-se que a presença do biosurfactante no meio reacional ocasionou um aumento de 100% na atividade da enzima sobre o substrato gordura de frango. No entanto, para o substrato gordura de coco o resultado foi ligeiramente menos expressivo. Os valores de porcentagem de hidrólise obtidos para os substratos testados estão apresentados na Tabela 33.

A partir dos resultados obtidos nesse experimento, partiu-se para a determinação das melhores concentrações de enzima e de biosurfactante necessárias para atingir 100% de hidrólise para o substrato gordura de frango, o qual é composto basicamente por triglicerídios contendo ácidos graxos de cadeia curta, considerados substratos ideais para atuação da enzima de *Rhizopus* sp.. A hidrólise enzimática desses triglicerídios resulta na liberação específica de ácidos graxos de alto valor agregado, os quais podem ser usados nos mais diversos segmentos industriais.

Os substratos gordura de coco, gordura de frango e RPB1 apresentaram os seguintes números de saponificação: 236,78 mg KOH; 189,65 mg KOH e 15,71 mg KOH, respectivamente.

Tabela 33: Influência da adição de biosurfactante na hidrólise de diferentes substratos pela enzima lipase.

Substrato	Porcentagem de hidrólise com biosurfactante	Porcentagem de hidrólise sem biosurfactante
Gordura de coco	14	10
Gordura de frango	16	7
RPB 1	41	26

Determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante

Para essa determinação foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com pontos axiais mais 3 pontos centrais, onde as variáveis independentes foram concentração de enzima lipase e concentração do biosurfactante, considerando-se a variável dependente a porcentagem de hidrólise do substrato gordura de frango. As mesmas condições de reação foram usadas como descrito anteriormente no item 4.17.2. As amostras foram analisadas após 2, 6, 12 e 24 h. Observou-se que a porcentagem de hidrólise aumentou no decorrer do tempo, sendo atingido mais de 90% de hidrólise do substrato após 24 h de reação. Devido a isso, os valores

encontrados para esse tempo reacional foram escolhidos para dar prosseguimento a análise do planejamento. Na Tabela 34 é mostrada a matriz obtida, a qual foi usada para confecção da superfície de resposta e superfície de contorno apresentadas nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Na Tabela 35 são apresentados a influência das variáveis avaliadas nesse planejamento e na Tabela 35 podemos observar os resultados gerados no software STATISTICA para o coeficiente de regressão, onde foram considerados apenas as variáveis significativas.

O coeficiente de regressão (Tabela 36) forneceu o modelo matemático abaixo, obtendo-se um bom ajuste do modelo de acordo com o valor de R^2 , ou seja, aproximadamente 90 % das variações são explicadas pelo modelo. Para a construção da equação matemática foram considerados apenas os fatores significativos.

Equação 2: Modelo matemático codificado

$$Y_{\text{codificado}} = 15,191 x_1 - 5,009 x_1^2 + 14,774 x_2 - 15,524 x_2^2$$

A análise de variância (Tabela 37) forneceu o valor de 13,62 para $F_{\text{calculado}}$, o qual foi mais de três vezes maior que o valor de F_{tabelado} (4,53), indicando que o modelo matemático obtido é válido e preditivo.

Tabela 34: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante.

Ensaio	Enzima Lipase (mg/mL)	Biosurfactante (%)	Hidrólise (%)
1	-1	-1	34,31
2	+1	-1	76,32
3	-1	+1	52,65
4	+1	+1	90,96
5	0	-1,41	19,97
6	0	+1,41	80,16
7	-1,41	0	56,35
8	+1,41	0	85,49
9	0	0	81,49
10	0	0	82,38
11	0	0	83,70

Tabela 35: Efeito das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante.

Fatores	Efeitos
Principais interações	82,517
(1) Enzima (L)	30,382
Enzima (Q)	-10,019
(2) Biosurfactante (L)	29,549
Biosurfactante (Q)	-31,049
(1) e (2)*	-1,850
* fator não significativo	$R^2 = 89,89\%$

Tabela 36: Coeficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante, considerando apenas os valores significativos no limite de confiança de 95 %.

Fatores	Coeficiente de regressão
Principais interações	82,517
(1) Enzima (L)	15,191
Enzima (Q)	- 5,009
(2) Biosurfactante (L)	14,775
Biosurfactante (Q)	- 15,525
$R^2 = 89,83\%$	

Tabela 37: Análise de variância do planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da melhor concentração de enzima e biosurfactante.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	5078,207	4	1269,551	13,62
Resíduo	559,205	6	93,20	
Falta de ajuste	556,732	4		
Erro puro	2,473	2		
TOTAL	5637,412	16		

$F_{\text{tabelado}} = 4,53$

$R^2 = 89,82\%$

$R = 0,83$

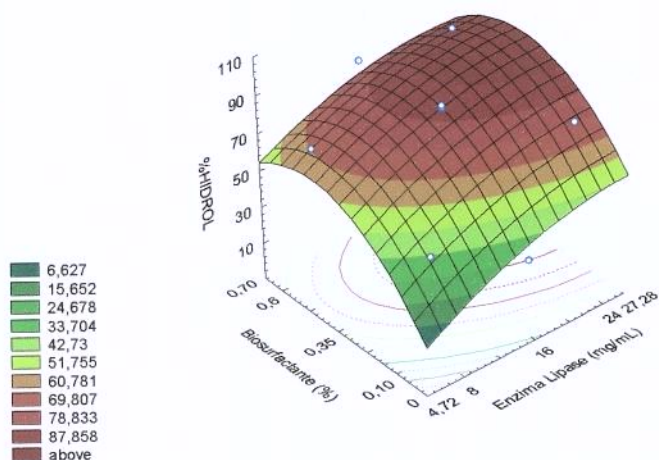


Figura 20: Superfície de Resposta

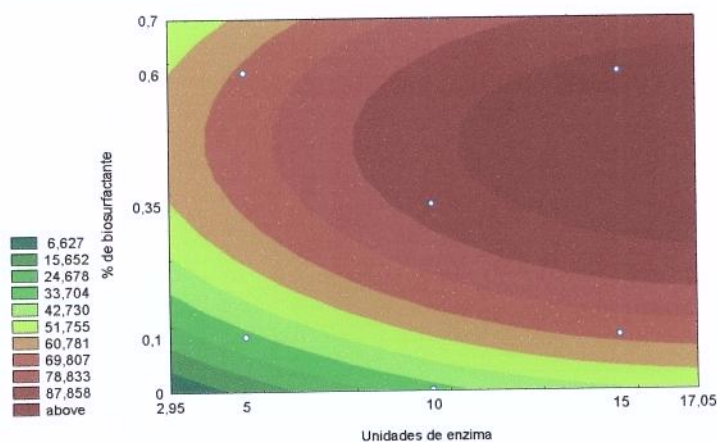


Figura 21: Superfície de Contorno

Através da análise das superfícies de resposta e de contorno (Figuras 20 e 21) verificou-se que os pontos centrais do planejamento experimental proposto (0,35% de biosurfactante e 10 unidades de enzima) encontram-se dentro da faixa ótima para hidrólise do substrato gordura de frango.

A proporção de enzima lipase e biosurfactante encontrada foi seguida para determinação da cinética de hidrólise para os substratos gordura de frango e gordura de coco, onde os dados estão apresentados na Figura 22.

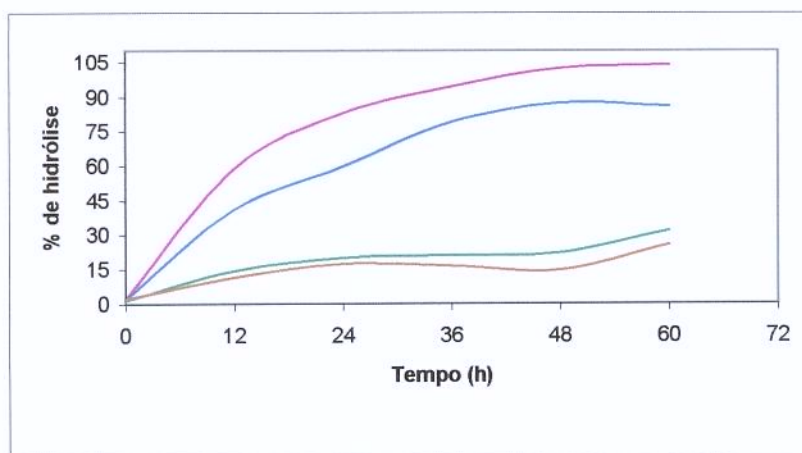


Figura 22: Influência da adição de biosurfactante na hidrólise de gordura de coco e gordura de frango pela enzima lipase de *Rhizopus* sp..

Gordura de coco c/ biosurfactante (—) Gordura de frango c/ biosurfactante (—)
 Gordura de coco s/ biosurfactante (—) Gordura de frango s/ biosurfactante (—)

É bastante nítido, pela observação da Figura 22, que a presença de biosurfactante no meio reacional provoca um expressivo aumento na taxa de reação, garantindo até 100% de hidrólise do substrato gordura de coco e próximo a isso (87%) do substrato gordura de frango, contra 31,5% e 25,3%, na ausência do biosurfactante, para gordura de coco e de frango, respectivamente. De acordo com os resultados ilustrados na Figura 22, pode-se verificar que a taxa de hidrólise praticamente se estabiliza após 48 horas de reação, independente da presença do biosurfactante.

Durante as 60 horas de reação do ensaio, a acidez titulável do branco não foi alterada, mostrando que, nas condições de reação, não há a ocorrência de hidrólise espontânea dos substratos testados.

Em anos recentes, alguns autores têm relatado o efeito benéfico do uso de surfactantes como aditivo em reações envolvendo lipases tanto para hidrólise quanto para síntese (Yasuda *et al.*, 2000). Vários trabalhos demonstram ainda a prévia modificação da enzima com o surfactante como bastante eficiência no aumento não só da atividade como também da enantioseletividade da mesma (Mogi *et al.*, 1999). Em alguns casos, principalmente os que envolvem reações em meio de solvente orgânico, o efeito benéfico é creditado à maior solubilidade da enzima no meio. Em outros casos, como no do presente estudo, o aumento da

eficiência na hidrólise deve-se principalmente à ação emulsificante do biosurfactante utilizado, que reduz o diâmetro das gotículas de gordura no meio, aumentando a área de contato entre enzima e substrato.

Influência da adição de surfactantes químicos na atividade da lipase

Após determinada as concentrações ideais de biosurfactante e enzima para hidrólise do substrato gordura de frango, avaliou-se a influência da adição de surfactantes sintetizados quimicamente na atividade da enzima lipase de *Rhizopus* sp..

Os resultados estão demonstrados na Figura 23, onde observa-se nitidamente que o maior efeito na atividade da enzima é produzido pelo biosurfactante, sendo que a adição dos surfactantes químicos provocou até uma pequena inibição na atividade da mesma.

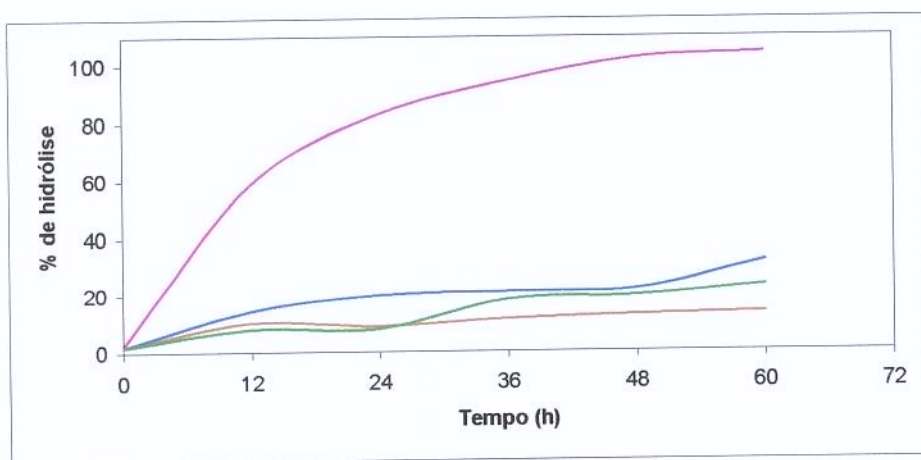


Figura 23: Influência da adição de surfactantes na atividade da enzima lipase.

Com biosurfactante (—) Sem surfactante (—)
Com Triton x-100 (—) Com Tween 20 (—)

O efeito desses surfactantes químicos foram também testados por Yasuda *et al.* (2000) na atividade de transesterificação da enzima lipase de *Rhizopus chinensis*, onde a adição de 2% Triton x-100 aumentou a atividade da enzima de 0,047 para 0,333 KU/g-lipase. Entretanto, a presença de Tween 20 na mesma quantidade não afetou a atividade de transesterificação da mesma.

6. CONCLUSÕES:

- O microrganismo selecionado de maior interesse foi identificado como *Serratia marcescens*.
- Dentre os meios testados, o Meio 1 contendo peptona e glicerol foi o mais apropriado para produção de biosurfactante pela linhagem em estudo.
- A otimização do processo de produção do biosurfactante foi realizada através de Planejamento Experimental, onde obteve-se a faixa ótima das concentrações de peptona entre 0,17 a 0,4% e de glicerol entre 2,0 a 3,14%, nas condições adequadas de temperatura (35⁰C) e pH (7,0).
- A produção de biosurfactante pela linhagem de *S. marcescens* LB006 foi notadamente influenciada pela presença de compostos insolúveis no meio, tanto de hidrocarbonetos como de óleos vegetais.
- O microrganismo estudado produziu biosurfactante em resíduos provenientes do abatedouro de frangos, porém o mesmo não foi observado quanto aos outros resíduos testados.
- O biosurfactante produzido demonstrou uma boa atividade emulsificante quando comparado aos valores previamente descritos na literatura.
- A adição do biosurfactante no meio reacional aumentou consideravelmente a atividade hidrolítica de lipase de *Rhizopus* sp., representando mais de 100% para o substrato gordura de frango.
- Quando comparado aos surfactantes químicos normalmente utilizados, o biosurfactante produzido apresentou maior influência na atividade da enzima lipase de *Rhizopus* sp.

- Com base na atividade emulsificante e na excelente atuação do biosurfactante produzido junto a enzima lipase, evidencia-se sua potencial aplicação no uso desse composto em processos de recuperação de resíduos oleosos e na limpeza de plantas industriais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, p. 315-324, 1991.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 31, p. 488-494, 1968.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 198, p. 44-47, 2000
- BANAT, I. M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 80-88, 1991.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. São Paulo:Editora da UNICAMP, 1996.
- BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. JOHN G. HOLT; NOEL R. KRIEG; PETER H. A. SNEATH; JAMES T. STALEY; STANLEY T. WILLIAMS, 9 ed., Williams & Wilkins eds., Baltimore, 1994.
- BLOOMBERG, G. Designing proteins as emulsifiers. **Lebensmitteltechnologie**, v. 24, p. 130-131, 1991.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 13, p. 61-64, 1991.
- CARINS, W. L.; COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; WOOD, J. M.; KOSARIC, N. Characterization of *Nocardia amaree* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p. 362-366, 1982.

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA - ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Isolation and selection of biosurfactant - producing bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p. 82-84, 1996.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 747-750, 1984.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1426-1429, 1983.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 173-176, 1984.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1993. p. 65-97.

FERRAZ, C.; DE ARAÚJO, A. A.; PASTORE, G. M. The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, 2002.

FERRAZ, C.; NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production of Biosurfactants using Agroindustrial Wastes. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais**. Paraná, 2001. p. 312.

FÖRSTER, M.; JOHANNA, M.; HORST, D.; SCHELLENBERGER, A. Immobilization in polyelectrolyte complex capsules: encapsulation of a gluconate-oxidizing *Serratia marcescens* strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 572-577, 1996.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 237-246, 1991.

- GREEK, B. F. Detergent industry ponders products for new decade. **Chemical Engineering News**, v. 68, p. 37-38, 1990.
- GREEK, B. F. Sales of detergents growing despite recession. **Chemical Engineering News**, v. 69, p. 25-52, 1991.
- GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. The genus *Serratia*. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 221-248, 1978.
- GUTNICK, D. L.; MINAS, W. **Biochemistry Society Trans.** v. 15, p. 22-35, 1987.
- HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advance Biochemistry Engineering Biotechnology**, v. 33, p. 54-93, 1986.
- HERDEGGER, M. A. K.; KOCH, U. A.; OCHSNER, A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Cloning and heterologous expression of a gene encoding an alkane-induced extracellular protein involved in alkane assimilation from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3679-3687, 1994.
- HOMMEL, R.; STÜER, O.; STUBER, W.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 199-205, 1987.
- HOROWITZ, S.; CURRIE, J. K. Novel Dispersants of silicon and aluminum nitride. **Journal Dispersion Science Technology**, v. 11, p. 637-659, 1990.
- HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W. N. Isolation and Characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal Indian Microbiology**, v. 6, p. 243-248, 1990.
- IGUCHI, T.; TAKEDA, I.; OHSAWA, H. Emulsifying factor of hydrocarbon producer by hydrocarbon-assimilating yeast. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 33, p. 657-658, 1969.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactant by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.
- JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

- KACHHOLTZ, T.; SCHLINGMANN, M. Possible Food and Agricultural Applications of Microbial Surfactants. In: Kosaric, N.; Carins, W. L.; Gary, N. C. C. (eds.). **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987, p. 183-210.
- KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **Journal of Bacteriology**, v. 131, p. 917-921, 1977.
- KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Partition of alkane by an extracellular vesicles derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal Bacteriology**, v. 140, p. 707-712, 1979.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77 (1), p. 116-126, 1999.
- KLEKNER, V.; KOSARIC, N. Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric, N. (ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1993, p. 329-372.
- KOCH, A. K.; REISER, J.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1355, 1989.
- KOSARIC, N. **Biosurfactants: Production, Properties and Applications**. Kosaric, N. (ed.). New York: Marcel Dekker Inc., Surfactants Science Series, 1990, v. 48.
- KOSARIC, N.; CHOI, H. Y.; BHASZCZYK, R. Biosurfactant production from *Nocardia SFC-D*. **Tenside Surfactant and Detergent**, v. 27, p. 294-297, 1990.
- KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (eds.). **Biosurfactants and biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., Surfactant Science Series, 1987, v. 25.
- KRETSCHMER, A.; WAGNER, F. Characterization of biosurfactant intermediates of trehalose dicorynomycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 753, p. 306-313, 1983.
- LAI, D. T.; O'CONNOR, C. J. Synergistic effects of surfactants on kid pregastric lipase catalyzed hydrolysis reactions. **Longmuir**, v. 16, p. 115-121, 2000.
- LANG, S.; WAGNER, F. Bioconversion of oils and sugars to glycolipids. In: KOSARIC, N. (ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1993, p. 205-227.

- LIN, S. C., GOURSARD, J. C.; KRAMER, P. J.; GEORGIOU, G.; SHARMA, M. M. Production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. In: Donaldson, E. C. (ed.). **Microbial Enhancement of Oil Recovery – Recent advances**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990, p. 219-226.
- LIN, S. C.; CARSWELL, M. M.; GEORGIOU, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 281-285, 1994.
- LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.
- LINDUM, P. W.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; EBERL, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. N-acil-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 6384-6388, 1998.
- LIU, Y.; XU, J.; HU, Y. Enhancing effect of tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 523-529, 2000.
- MACDONALD, C. R., COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface-active lipids from nocardia-erythropolis grown on hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 117-123, 1981.
- MACINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M.; NAGLE, P. D. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **Journal Indian Microbiology**, v. 5, p. 95-102, 1990.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2, p. 237-241, 1999.
- MAKULA, R. A.; FINNERTY, W. R. Microbial assimilation of hydrocarbon: identification of phospholipids. **Journal Bacteriology**, v. 103, p. 348-355, 1970.

- MARAHIEL, M.; DENDERS, W.; KRAUSE, M.; KLEINKAUF, H. Biological role of gramicidin S in spore functions. Studies on gramicidin-S mutants of *Bacillus brevis* 9999. **European Journal Biochemistry**, v. 99, p. 49-52, 1977.
- MATSUYAMA, T., FUJITA, M.; YANO, I. Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 28, p. 125-129, 1985.^b
- MATSUYAMA, T.; KANEDA, K.; YANO, I. Two kinds of bacterial wetting agents: aminolipid and glycolipid, *Procc. Japan Society Mass Spectrometry*, v. 11, p. 125-128, 1986.^a
- MATSUYAMA, T.; KANEDA, K.; NAKAGAWA, Y.; ISA, K.; HARA-HOTTA, H.; YANO, I. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and independent spreading growth of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 1769-1776, 1992.
- MATSUYAMA, T.; MURAKAMI, T.; FUJITA, M.; FUJITA, S.; YANO, I. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 865-875, 1986.
- MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M.; NAKAGAWA, Y. Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which producers surface active exolipids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 61, p. 243-246, 1989.
- MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M.; YANO, I. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1186-1188, 1987.
- MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 71, n. 1, p. 61-64, 1994.
- MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils. **Environmental and Health Perspectives**, v. 103, p. 59-62, 1995.
- MOGI, K.; NAKAJIMA, M.; MUKATAKA, S. Surfactant modification of lipases for lipid interesterification and hydrolysis reactions. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, 76, p. 1259-1264, 1999.
- MØRKBÆK, A. N.; DEGN, P.; ZIMMERMANN, W. Deinking of soy bean oil based ink printed paper with lipases and a neutral surfactant. **Journal of Biotechnology**, 67, p. 229-236, 1999.

- MULLIGAN, C. ; COOPER, D. G. Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 160-162, 1985.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 23-29, 1990.
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Decker Inc., 1993, p. 392-371.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F.; JAMES, S.; BENNETT, H. P. J. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3812-3820, 1999.
- MUTUA, L. N.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of phospholipids: incorporation of n-3-fatty acids into biosurfactants. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 70, p. 125-128, 1993.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 47: 209-214, 1995.
- PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant, Effects on Respiratory Activity and Growth, **Biotechnology**, v. 8, p. 91-101, 1979.
- PARKINSON, M. Bio-surfactants. **Biotechnology Advance**, v. 3, p. 65-83, 1985.
- PATEL, M.N.; GOPINATHAN, K.P. Lysozyme sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1224-1226, 1986.
- PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Control biosynthesis of Val-7 and leu-7 surfactins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 515-517, 1992.
- POLMAN, K.; BALA, G.A.; ST.CLAIR, P. Models for the biological production of glycerol and biosurfactants from potato-processing industry residuals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51/52, p. 511-517, 1995.
- PRUTHI V., CAMEOTRA S. S. Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 3, n. 4, p. 533-537, 2000.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production by acetone precipitation. **Biotechnology Techniques**, v. 9, p. 271-276, 1995.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiol. & Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 133-135, 1997.

PUJARI V., CHANDRA T. S. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Eremothecium*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 31-37, 2000.

RAPP, P.; BOCK, H.; URBAN, E.; WAGNER, F.; GEBETSBERGER W.; SCHULZ, W. Use of Trehalose Lipids in enhance oil recovery. **Deschema Monogr. Biotechnology**, v. 81, p. 177-185, 1987.

REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot-plant production of rhamnolipid biosurfactant by *pseudomonas-aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, N. 5, p. 985-989, 1986.

REISER, J.; KOCH, A. K., OCHSNER, U. A. ; FIECHTER, A. Genetics of surface active compounds. In: KOSARIC, N. (ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**, New York: Marcel Decker Inc., 1993, p. 231-249.

REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K., KAPPELI, O. Structure, properties, and production of biosurfactants. In: ORINGER, J.W.; TILLINGEST, H.S. (eds.). **Advances in Applied Biotechnology Series**, London: Gulf Publishing Company, 1989, v.3, p. 85-97.

REISMAN, H. **Economic Analysis of Fermentation Process**, CRC Press, Boca Raton, 1988.

ROSEN, M. The relation of structures to properties in surfactants. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 49, p. 293-297, 1971.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, Z. E. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 317-322, 1988.

- ROSEMBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBONOVITZ, C.; GUTNICK, D. L. Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, p. 402-408, 1979.
- ROUBIN, M. R.; MULLIGAN, C. N. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n.9, p. 854-859, 1989.
- RUBINOWITZ, C.; GUTNICK, D. L.; ROSEMBERG, E. Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. **Journal Bacteriology**, v. 152, p. 126-132, 1982.
- SANTOS, C. F. **Produção, purificação e caracterização de biosurfactantes produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis***. Campinas, 2001. 213 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SANTOS, C. F. **Estudo do Processo Fermentativo para Produção de Biosurfactante por Linhagem de Levedura**, Campinas, 1997. 100 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SARKAR, A. K.; GOURSAND, J. C.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. A critical evaluation of MEOR process. **In Situ**, v. 13, p. 207-238, 1989.
- SCHEIBENBOGEN, K.; ZYTHER, R. G.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Enhance removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 59, p. 53-59, 1994.
- SHABTAL, Y.; WANG, D. I. C. Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed. **Biotechnology Bioengineering**, v. 35, p. 753-765, 1989.
- SHENNAN, J. L.; LEVI, J. D. Microbial enhanced oil recovery. In: Kosaric, N.; Cairns, W. L.; Gray, N. C. C. **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987, p. 163-181.
- SHEPPARD, J. D.; COOPER, D. G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 325-336, 1990.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110, 1987.

SINGER, M. E. Microbial biosurfactants. **Microbial Oil Recovery**, v. 1, p. 19-38, 1985.

SINGH, M.; DESAI, J. D. Hydrocarbon emulsifying activity of bacterial strains: potential of *Arthrobacter paraffineus*. **Currency Science**, v. 57, p. 1307-1308, 1988.

STANGUELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants, Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v. 81, p. 4-12, 1997.

SUZUKI, T.; HAYASHI, K.; FUJIKAWA, K.; TSUKAMOTO, K. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E₁ with colistin A and polymyxin E₂ with colistin. **Journal of Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 226-227, 1965.

SUZUKI, K.; MATSUNAGA, H.; ITAMI, C.; KIMURA, Y. Polymyxin B enhances formation of a pigment, a peptide-ferropyrimine complex, in *Serratia marcescens*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, V. 57, n. 10, p. 1763-1765, 1993.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, M.G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiological Letters**, v. 128, p. 101-106, 1995.

THOMPSON, D.N.; FOX, S.L.; BALA, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84/86, p. 917-929, 2000.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 757-763, 1989.

YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 64, p. 1657-1662, 1987.

YASUDA, M.; KIGUCHI, T.; OGINO, H; ISHIKAWA, H. Effect of additives on transesterification activity of *Rhizopus chinensis* lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 681-683, 2000.

VALRAEDS-MARTINE, M. C.; VANDER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J., Physiochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biological interfaces**, v. 8, p. 51-61, 1996.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241-252, 1991.

WASSERMAN, H.; KEGGI, J.; McKEON, J. The structure of serratamolide. **Journal American Society**, v. 84, p. 2978-2982, 1961.