

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO INDUSTRIAL
DE UMA MISTURA COMPOSTA DE LIPASE ALCALINA
DE *Fusarium oxysporum* E BLOSSURFATANTE DE *Bacillus
subtilis*.**

Cedenir Pereira de Quadros
Farmacêutico Bioquímico

Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Q22e Quadros, Cedenir Pereira de
Estudo do potencial de aplicação industrial de uma mistura composta de lipase alcalina de *Fusarium oxysporum* e biossurfatante de *Bacillus subtilis* / Cedenir Pereira de Quadros. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos
1. Remoção de gordura. 2. Concentração mínima inibitória. 3. Aço inoxidável. 4. Estabilidade enzimática. 5. Tecidos de algodão. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of the industrial application potential of a mixture composed of an alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and a biosurfactant from *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Oil removal, Minimum inhibitory concentration, Stainless steel, Enzymatic stability, Cotton fabrics

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Gisella Maria Zanin

Janaina Nicanuzia dos Prazeres

Jane Gonçalves Menegaldo Snow

Luciana Francisco Fleuri

Mário Roberto Maróstica Júnior

Marta Cristina Teixeira Duarte

Yong Kun Park

Data de defesa: 29/05/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Gláucia Maria Pastore
UNICAMP

Dr^a. Gisella Maria Zanin
UEM

Dr^a. Janaína Nicanuzia dos Prazeres
CARGO FRESH

Dr^a. Jane Gonçalves Menegaldo Snow
ITAL

Dr^a. Luciana Francisco Fleuri
UNIMEP

Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
UNICAMP

Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte
UNICAMP

Dr. Yong Kun Park
UNICAMP

À meus pais *Seu Borges* e *D. Negra*,

aos meus irmãos *Zane* e *Fábio*,

dedido e agradeço especialmente.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos, por possibilitar a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À Prof^ª Gláucia pela orientação e oportunidade;

Aos Membros da banca examinadora pelo auxílio na correção, sugestões e críticas;

À Prof^ª Marta por me receber tão gentilmente em seu laboratório no CPQBA;

Aos Professores: Hélia, Isabel, Gabriela, Maria Regina, Lucia, Marcelo, Hiroshi, Park, Delia por compartilhar ensinamentos;

Aos meus colegas de Bioaromas: Andréia, Mariana, Mário Mano, Fábio, Daniele, Danizinha, Rosângela, Juliano, Xispita, Nadir, Juliana, Cléber, Angélica, Márcia Nitschke, Luciana, Dora, Livia, Gustavo, Eliane, Cecília, Renata, Tiago, Samuel, Júnio, Ana Simiqueli, Giselle e demais colegas, pela vivência e aprendizado diário no laboratório;

Aos Professores, Colegas e Técnicos dos Laboratórios de Bioquímica, Carotenóides, Análises de Alimentos, Sistemática, Higiene, Microbiologia (FEA), Microbiologia (CPQBA), Óleos e Gorduras, Toxicologia, Bioprocessos, Química de Alimentos, pela ajuda, disponibilidade, boa vontade, empréstimo de material, uso de equipamentos e troca de experiências;

Ao pessoal da Biblioteca, Centro de Informática e Secretaria de Pós, pelo auxílio e atenção;

Aos amigos Janice, Valéria, André, Rosiele, Rachel, Cristiano, Fabiane, Roger, Éder, Deise, Stanislau, Bernardo, Roberta, Márcia Crestani, Fabiane La Flor, Silvana, Giovanna, Cíntia, Adriano, Cláudia, Elizete, Lísia, Maurício, Camila, Regina, Prof^ª Helena, pelo apoio, parcerias, coleguismo, viagens, descontrações e convívio durante todo esse tempo;

Ao Fábio, Éder e Roger, agradeço em especial;

A toda minha família pelo incentivo, confiança e apoio incondicional;

Claro que não cabem todos aqui, mas saibam que na memória e no coração tem lugar de sobra para lembrar de todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta história...

... MUITO OBRIGADO !

SUMÁRIO

RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
OBJETIVOS	xxiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	xxv
Capítulo 1.....	1
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE ALCALINA E BIOSSURFATANTE	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Biotecnologia	5
1.2 Enzimas.....	6
1.3 Fontes de lipases	7
1.4 Biossurfatantes.....	8
1.4.1 Surfactina	9
1.5 Importância econômica.....	10
2.1 Aplicação de lipase na indústria de alimentos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Produção de enzimas alcalinas	15
3.2 Estabilidade enzimática	15
3.3 Produção de biossurfatantes por micro-organismos	16
4 CONCLUSÃO	25
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

Capítulo 2.....	39
Functional and physicochemical characterization of the mixture of alkaline lipase from <i>Fusarium oxysporum</i> 152B and biosurfactant from <i>Bacillus subtilis</i> LB5a.....	40
Abstract.....	41
1 Introduction.....	42
2 Materials and methods	44
2.1 Strains	44
2.2 Alkaline lipase (AL) production	44
2.3 Biosurfactant (BS) production	45
2.4 Alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix).....	45
2.5 Assay of lipase activity	45
2.6 Surface activity measurement	46
2.7 Critical micelle dilution (CMD) measurement	46
2.8 Effect of biosurfactant on enzymatic activity	46
2.9 Effects of temperature on AL/BS mix stability	46
2.10 Effects of pH on AL/BS mix stability	47
2.11 Critical micelle concentration (CMC) measurement	47
2.12 Effects of inorganic salts and others compounds on AL/BS mix activity	47
2.13 Emulsification activity.....	47
2.14 Statistical analysis.....	48
3 Results and discussion	48
3.1 Effect of biosurfactant concentration on enzymatic activity	48
3.2 Effect of temperature on LA/BS stability	50
3.3 Effect of pH on LA/BS stability	51
3.4 Effect of alkaline lipase on critical micellar concentration	53
3.5 Effect of ions, oxidizing, reducing, chelating and preservative agents	53
3.6 Emulsification capacity.....	57
4 Concluding remarks	59
5 Acknewlegments.....	60
6 References.....	60

Capítulo 3.....	67
An innovative mixture for detergent formulation: alkaline lipase and biosurfactant	68
Abstract.....	69
Introduction.....	70
Experimental Procedures	72
Strains	72
Materials	73
Production of alkaline lipase (<i>AL</i>)	73
Production of biosurfactant (<i>BS</i>).....	73
Effects of surfactant and biliar salt on stability of lipase.....	74
Preparation of soiled fabric.....	74
Washing solutions.....	75
Washing procedure	75
Measurement of oil removal	75
Effect of <i>AL</i> and <i>BS</i> concentrations on oil removal.....	76
Effect of alkaline lipase/biosurfactant mixture (<i>AL/BS</i> mix) on oil removal	76
Effect of lipase on oil removal by other detergents	76
Statistical analysis	77
Results and Discussion	77
Effect of surfactants on enzyme stability.....	77
Effect of alkaline lipase on oil removal from cotton fabrics	78
Effect of biosurfactant on oil removal	80
Effect of lipase on oil removal by other detergents.....	82
Conclusion	83
Acknowledgments	84
References.....	84
Capítulo 4.....	89
Remoção de diferentes triglicerídeos de superfície rígida por uma mistura de lipase alcalina e bio surfatante.....	90
Resumo	91

Abstract.....	92
1. Introdução	93
2. Materiais e Métodos.....	97
2.1 Materiais	97
2.2.1 Gorduras.....	97
2.1.2 Superfície rígida.....	97
2.2 Produção da lipase alcalina (LA)	97
2.3 Produção do biossurfatante (BS)	98
2.4 Preparo da mistura de lipase e biossurfatante (LA/BS)	99
2.5 Formulação da solução detergente.....	99
2.6 Determinação da eficiência de limpeza	99
2.7 Composição do sistema de limpeza	99
3. Resultados e discussão.....	100
3.1 Remoção de gordura de superfície rígida	102
4. Conclusões	109
5. Agradecimentos	110
6. Referências Bibliográficas	110
 Capítulo 5.....	 113
BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A MIXTURE OF BIOSURFACTANT OBTAINED	
FROM <i>B. subtilis</i> LB5a AND ALKALINE LIPASE OBTAINED FROM <i>F. oxysporum</i>	
152B.....	114
ABSTRACT.....	115
RESUMO.....	116
1 INTRODUCTION	117
2 MATERIALS AND METHODS.....	119
2.1 Biosurfactant (BS) production	119
2.2 Determination of surface tension activity	119
2.3 Critical micelle dilution (CMD) measurement	120
2.4 Alkaline lipase (AL) production	120
2.5 Alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) preparation.....	121

2.6 Microorganisms strains for antimicrobial assays.....	121
2.7 Inoculum preparation.....	121
2.8 Minimum inhibitory concentration (MIC).....	122
2.9 Effect of AL/BS mix on biofilm of <i>L. innocua</i>	122
2.10 Statistical analysis.....	123
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	123
3.1 Biosurfactant stability	123
3.2 Minimum inhibitory concentration (MIC).....	124
3.3 Effect of AL/BS mix on removal of <i>L. innocua</i> biofilm from stainless steel.....	128
ACKNOWLEDGMENTS	129
REFERENCES	129
CONCLUSÕES GERAIS.....	135
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figure 1. Critical micelle concentration (CMC) determination of biosurfactant from *B. subtilis* LB5a (BS) and alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) through ST (superficial tension) measurements of successive dilutions..... 53
- Figure 2. Emulsifying index (EI %) of different hydrocarbons (A) and vegetable oils (B) with the alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) as emulsifier..... 58

Capítulo 3

- Fig. 1 Effect of different anionic surfactant concentrations on the stability of *F. oxysporum* alkaline lipase (1 mg/mL^{-1})..... 77
- Fig. 2 Effect of alkaline lipase from *F. oxysporum* on oil removal from cotton fabrics..... 79
- Fig. 3 Effect of biosurfactant from *B. subtilis* on oil removal from cotton fabrics..... 80
- Fig. 4 Effect of alkaline lipase from *F. oxysporum* and biosurfactant from *B. subtilis* mixture (AL/BS mix) on oil removal from cotton fabrics. 81
- Fig. 5 Effect of absence and presence of *F. oxysporum* lipase (0.5 mg/mL^{-1}) on olive oil removal from cotton fabrics using different detergents (10 mg/mL^{-1}) and *B. subtilis* biosurfactant (3 mg/mL^{-1})..... 82

Capítulo 4

- Figura 1: Porcentagem de aumento da remoção de gordura suína de superfície de aço inoxidável AISI 304. 103
- Figura 2: Porcentagem de aumento da remoção de manteiga de superfície de aço inoxidável AISI 304.. 104
- Figura 3: Porcentagem de aumento da remoção de gordura de frango de superfície de aço inoxidável AISI 304..... 105
- Figura 4: Porcentagem de aumento da remoção de creme de leite de superfície de aço inoxidável AISI 304. 106
- Figura 5: Efeito na remoção de diferentes tipos de gordura de superfície de aço inoxidável AISI 304.. 107
- Figura 6: Modelo proposto correlacionando a penetração do surfatante (liquefação) com o processo de remoção da sujeira 108

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Effect of different biosurfactant concentrations on alkaline lipase ¹ enzymatic activity ²	48
Table 2. Effect of temperature on enzymatic stability, ST, CMD ⁻¹ and CMD ⁻² of the AL/BS mix ¹	51
Table 3. Effect of pH on enzymatic stability, ST, CMD ⁻¹ and CMD ⁻² of the AL/BS mix ¹	52
Table 4. Effect of different compounds on enzymatic activity, ST, CMD ⁻¹ and CMD ⁻² of the AL/BS mix ¹).	56

Capítulo 3

Table 1. Composition of washing solutions	75
---	----

Capítulo 4

Tabela 1: Composição da solução lavagem	100
Tabela 2: Composição dos ácidos graxos das gorduras (%).....	101

Capítulo 5

Table 1. Effect of different alkaline lipase concentrations on surface activity of the biosurfactant.	124
Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) tests for AL/BS mix (mg.mL ⁻¹).....	125
Table 3. Number of <i>L. innocua</i> remaining on the stainless steel plates after treatment with sanitizer solutions.....	128

RESUMO

Na perspectiva de se tornar uma alternativa aos produtos já existentes para a indústria, foi proposto neste trabalho uma mistura inédita e original composta por uma lipase alcalina (*LA*) produzida por *Fusarium oxysporum* e biossurfatante (*BS*) produzido por *Bacillus subtilis*, a qual foi denominada de mistura *LA/BS*. O objetivo desta mistura foi remover materiais gordurosos de tecidos de algodão e de superfícies de aço inoxidável, assim como remover biofilmes de micro-organismos indesejáveis para a indústria de alimentos.

Primeiramente, a mistura *LA/BS* foi submetida a uma caracterização e verificação da manutenção das propriedades individuais de cada composto quando submetida aos diferentes tratamentos físico-químicos. A lipase alcalina manteve sua atividade enzimática na presença de 0,0001 a 0,01% de biossurfatante. O tensoativo, na mistura *LA/BS*, manteve sua característica de reduzir a tensão superficial da água para valores em torno de 30 mN.m⁻¹. Quando submetida a variações de temperatura (-4 a 30°C) por 24 h e de pH (6 a 10) por 48 h, a mistura *LA/BS* se mostrou bastante estável em suas propriedades, demonstrando um comportamento bastante semelhante ao encontrado na literatura. A concentração micelar crítica (CMC) do *BS* não foi alterada na presença da *LA*. A mistura não perdeu suas características frente a diversos sais inorgânicos (exceto pelo CuSO₄ para *LA* e Fe³⁺ para o *BS*), agentes oxidantes, redutores, quelantes e preservantes de alimentos. Além disso, funcionou como um ótimo agente emulsificante na presença de diversos hidrocarbonetos e óleos vegetais, apresentando um índice de emulsificação após 24 h (IE₂₄) em torno de 60%.

Subsequentemente, a lipase alcalina se apresentou mais estável frente a 0,1% de *BS* (98% de atividade residual) do que aos surfatantes sintéticos testados. Em seguida, avaliou-

se a sua capacidade de remover azeite de oliva impregnado em tecidos de algodão em uma solução. Uma alíquota de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ de *LA* foi capaz de remover 48% de gordura dos tecidos e 3 mg.ml^{-1} de *BS* cerca de 50%. A presença de 3 mg.ml^{-1} de *BS* no sistema contendo $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ de *LA* aumentou a remoção do azeite de oliva em 10%, demonstrando um efeito de sinergismo na mistura. Além disso, *LA/BS* teve um comportamento similar aos surfatantes alquil benzeno linear sulfonado (LAS) e o dodecil sulfato de sódio (SDS).

Superfícies rígidas de aço inoxidável foram recobertas com diferentes tipos de gorduras como gordura suína, gordura de frango, manteiga e creme de leite como forma de simular situações vistas em frigoríficos e laticínios. A presença do *BS* e da mistura *LA/BS*, de uma forma geral, melhorou a remoção das gorduras presentes nas placas conforme aumenta a concentração dos compostos. A mistura *LA/BS* melhorou a remoção de gordura suína, de frango e de creme de leite em 30; 35,1 e 29%, respectivamente. A remoção da manteiga foi a menos influenciada pelos detergentes. Como padrão de detergente foi utilizado o surfatante SDS na concentração de 1,5%.

A atividade antimicrobiana da mistura *LA/BS* foi realizada por meio de ensaio quantitativo pela concentração inibitória mínima (CIM). Entre todos os micro-organismos testados, somente *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e a *Listeria innocua* tiveram seus crescimentos afetados pela mistura. A bactéria *B. cereus* foi a mais sensível (CIM $0,013 \text{ mg.ml}^{-1}$). Em adição, o efeito de sanitizantes contra *L. innocua* aderidas ao aço inoxidável foi determinado por contagem em placas. Este método demonstrou que a presença de biossurfatante ou da mistura melhorou a remoção das células aderidas em relação ao tratamento sem sanitizantes, reduzindo a contagem, em média, $0,97 \text{ log.cm}^{-2}$. Entretanto, não houve diferença significativa entre os sanitizantes propostos e o detergente padrão SDS ($p < 0,05$).

ABSTRACT

Within the perspective of becoming an alternative to products already used in the industry, this study proposed an unprecedented and original mixture consisting of an alkaline lipase (*AL*) from *Fusarium oxysporum* and a biosurfactant (*BS*) from *Bacillus subtilis*, which will be called *AL/BS* mix. The aim of this mixture was to remove fatty residues from cotton fabrics and stainless steel surfaces, as well as to remove biofilms of undesirable microorganisms on rigid surface to food industry.

Firstly, the *AL/BS* mix was submitted to a characterization to verify the preservation of each compound individual properties when submitted to different physical and chemical treatments. The *AL* kept its enzymatic activity in the presence of 0.0001 to 0.01% of biosurfactant. The tensoactive agent, in the *AL/BS* mix, kept its characteristic of reducing the superficial tension of aqueous solutions to values around 30 mN.m⁻¹. When submitted to temperature (-4 to 30°C for 24 h) and pH (6 to 10 for 48 h) variations, the *AL/BS* mix proved quite stable in its properties, showing a behavior very similar to the ones found in literature. The *BS* critical micelle concentration (CMC) did not change in *AL* presence. The mix did not lose its characteristics in the presence of several inorganic salts (except CuSO₄ for *AL* and Fe³⁺ for *BS*), oxidizing, reducing, chelating and food preservative compounds. Apart from that, the *AL/BS* mix also proved an excellent emulsifying agent in the presence of several hydrocarbons and vegetable oils, showing emulsifying index around 60% after 24 h (EI₂₄).

Subsequently, the *AL* proved more stable in the presence of 0.1% *BS* (98% residual activity) than the tested synthetic surfactant, in the same concentrations. Next, the ability of the *AL/BS* mix to remove olive oil from cotton fabric in a solution was evaluated. The 0.5

mg.mL⁻¹ *AL* managed to remove 48% of the oil from cotton fabrics and 3 mg.mL⁻¹ *BS* managed to remove approximately 50%. The presence of 3 mg.mL⁻¹ *BS* in the system which contained 0.5 mg.mL⁻¹ *AL* increased the olive oil removal by 10%, showing a synergy effect in the mixture. Apart from that, *AL/BS* mix had a similar performance to sodium linear alkyl benzene sulphonate (LAS) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants.

Rigid stainless steel surfaces were covered with different types of fatty materials, such as pork fat, chicken fat, butter and whipped cream, to simulate situations existing in meat and dairy industries. The presence of *BS* and *AL/BS* mix, generally speaking, improved the fat removal from plates in pace with the increase of compounds concentration. The *AL/BS* mix improved the removal of pork and chicken fat, and whipped cream in 30, 35.1 and 29% respectively. Butter was the fat least influenced by detergents. Surfactant SDS concentration at 1.5% was used as detergent standard. This testing showed efficiency, sensitivity and it can be used to develop new formulations.

The anti-microbial activity of *AL/BS* mix was carried out by minimum inhibitory concentration (MIC) quantitative assays. Among all tested microorganisms, only *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Listeria innocua* had their growth affected by the mixture. *B. cereus* bacteria was the most sensitive (MIC 0.013 mg.mL⁻¹). Besides, the sanitizing effect against *L. innocua* that was attached to stainless steel was determined by plates counting. This assay proved that the presence of biosurfactant or the *AL/BS* mix improved the removal of adhered cells in relation to the treatment without sanitizers, reducing the count, in average, 0.97 log CFU.cm⁻². However, there has not been a significant difference between the proposed sanitizers and the standard detergent SDS ($p < 0.05$).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar as possíveis aplicações como detergente, sanitizante e desinfetante em tecidos de algodão e superfícies rígidas de uma mistura composta de lipase alcalina produzida por *Fusarium oxysporum* e biossurfatante produzido por *Bacillus subtilis* (mistura LA/BS).

Objetivos específicos

1. Verificar a atividade e a estabilidade das propriedades dos componentes da mistura em relação a diferentes condições de tratamento e presença de outros compostos;
2. Avaliar a capacidade da mistura em remover material lipídico de tecidos de algodão, visando ação detergente;
3. Avaliar a capacidade da mistura em remover materiais gordurosos de superfície de aço inoxidável, visando a sanitização de área industrial de alimentos.
4. Avaliar a capacidade da mistura em atividade antimicrobiana pelo método de concentração inibitória mínima (CIM) e remoção de biofilmes de *Listeria innocua* de placas de aço inoxidável.

INTRODUÇÃO GERAL

BIOTECNOLOGIA E RECURSOS RENOVÁVEIS

No mundo moderno, altamente dependente de energia, o petróleo não é somente a mais importante fonte de energia, mas também a matéria prima básica para a indústria química. Prevendo a lenta mas inexorável falta do produto, diversos países realizam pesquisas a fim de encontrar substitutos na natureza. Os Estados Unidos já estabeleceram como meta a obtenção de um quarto de todos os produtos básicos da química orgânica a partir de materiais renováveis, até 2030. Na Alemanha, atualmente, cerca de 10% dos produtos básicos da indústria química são obtidos de fontes renováveis. O Brasil, apesar da falta de recursos para a pesquisa, dispõe de diversas iniciativas na área. A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) está pesquisando a fabricação de polímeros (plásticos) naturais biodegradáveis a partir de bactérias, que se alimentam de açúcar. A Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (Copersucar) segue a mesma linha de pesquisa, enquanto que a BRASKEM, a maior petroquímica do país, vai produzir a resina plástica polietileno (usada em embalagens flexíveis) a partir do álcool. Segundo especialistas, este tipo de processo químico, conhecido como álcoolquímica, já se torna viável economicamente, dado o custo do barril de petróleo, que deverá definitivamente permanecer em torno de US\$ 70.

Em todo o mundo, a “biotecnologia branca”, como é chamada, encontra cada vez mais investidores. A mais recente edição do Fraunhofer Magazine, revista editada por um dos mais conceituados institutos de pesquisa em todo o mundo, localizado na Alemanha, informa que o uso dos materiais renováveis será um dos assuntos mais importantes na indústria química nos próximos anos. “Biotecnologia branca utiliza a natureza como uma fábrica química. Processos de produção química convencionais serão substituídos por microorganismos ou enzimas”, explica o professor Hirth, do Instituto de Tecnologia Química do instituto alemão. Estes processos, todavia, não são novos. Microorganismos e

enzimas são utilizados há milênios, para fermentação da cerveja e do vinho e fabricação do queijo, por exemplo. A biotecnologia moderna vai um pouco além: utiliza-se dos equipamentos para desenvolver novos métodos de produção na química de base e na química fina, desenvolvendo bioplásticos, aditivos para alimentos e diversos insumos para a indústria farmacêutica. Alguns produtos resultantes desta nova tecnologia são detergentes mais eficientes sem causar dano ao ambiente, etanol (processo em cuja aplicação industrial o Brasil é um dos precursores), ácidos cítricos e aminoácidos. A tendência é que cada vez mais os processos biotecnológicos substituam os químicos.

O Brasil, com seu clima e solo favoráveis, grande biodiversidade – principalmente na Amazônia, quase inexplorada pela ciência – é um dos grandes, se não o maior candidato a liderar o setor de biotecnologia branca. Até porque temos o maior programa mundial de geração de combustíveis, através de processo biotecnológico. O que efetivamente falta é um incentivo maior do governo, possibilitando o aumento das pesquisas em universidades e institutos. O caminho de grande fornecedor mundial de biocombustíveis que o país pretende ocupar, passa necessariamente pela biotecnologia.

Ricardo Rose

Diretor de Meio Ambiente e Sustentabilidade
Câmara de Comércio e Indústria Brasil-Alemanha
Colunista conceituado na área de Meio Ambiente.

Jornalista, autor de publicações sobre o setor ambiental.

http://www.planetaterra.org.br/noticias/ricardo_rose11.htm

Capítulo 1

Revisão bibliográfica:

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
LIPASE ALCALINA E BIOSSURFATANTE.**

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE ALCALINA E BIOSSURFATANTE

Cedenir Pereira de Quadros* e Gláucia Maria Pastore

Laboratório de Bioaromas, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual
de Campinas, Rua Monteiro Lobato 80, CEP: 13083-862, Campinas – SP, Brasil.

* A quem a correspondência deve ser enviada

e-mail: cdquadros@yahoo.com.br

Tel.: 55 19 3521 4090; Fax: 55 19 3521 3887

English title: Alkaline lipase and biosurfactant, production, characterization and application.

Artigo de Revisão submetido à Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

Campinas, 2009

RESUMO

Lipases e biossurfatantes podem ser chamados de biocompostos à medida que são produzidos por micro-organismos. Devido a isto, eles carregam o selo de produtos naturais, e assim possuem um apelo mercadológico que segue as tendências mundiais. As lipases são enzimas que se destacam cada vez mais no cenário da biotecnologia enzimática. Impulsionadas por sua versatilidade, que permite a catálise de reações de hidrólise e de síntese, muitas vezes de forma quimio-, régio- ou enantiosseletiva, as lipases são aplicadas em muitos setores como, por exemplo, a indústria de alimentos, farmacêutica, de química fina, oleoquímica, de biodiesel e de detergentes, entre outras. Nos últimos anos, tem-se estudado muito a elucidação da relação estrutura-função de lipases, bem como de seu mecanismo catalítico, na presença ou não de interfaces orgânico-aquosas. Já os biossurfatantes são compostos que reduzem a atividade superficial e interfacial, possuem capacidade emulsificante e antimicrobiana, etc. As maiores vantagens dos biossurfatantes residem em sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e diversidade estrutural. Todas essas características viabilizam o seu emprego em diversas indústrias do ramo alimentício, farmacêutico e ambiental. A combinação entre esses bioprodutos e suas aplicações, concomitantemente, ainda não é uma realidade, as pesquisas ainda estão em escala laboratorial e muito trabalho ainda é necessário. Espera-se, nos próximos anos, o desenvolvimento crescente do emprego de técnicas de engenharia e biologia molecular para a obtenção de biocompostos com propriedades melhoradas e uma ampliação da escala de produção.

Palavras-chaves: Biotecnologia, lipase microbiana, biossurfatante, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*, aplicação industrial.

ABSTRACT

Lipases and biosurfactants may be called bio-compounds as long as produced by microorganisms. Due to this fact, they carry the seal of natural products, and thus having a marketing appeal that follows the world trends. The lipases are enzymes that have been increasingly emphasized in the scenario of enzyme biotechnology. Driven by its versatility, allowing the catalysis of reactions of hydrolysis and synthesis, often chimio-, region- or enantioselectivities, the lipases are applied in many sectors such as; food processing industry, pharmaceuticals, fine chemicals, oleochemical, bio-diesel and detergents, among others. Recently special attention has been paid to the elucidation of the structure-function of lipase, as well as its catalytic mechanism, in the presence or absence of aqueous-organic interfaces. The biosurfactants are compounds that reduce the surface and interfacial activity, have emulsifying, antimicrobial properties etc. The major advantage of biosurfactants lies on the fact of its biodegradability, low toxicity and structural diversity. All these characteristics enable its use in various branches of the food, pharmaceutical and environmental industries. The combination of these bio-products and its applications are not, concomitantly, a reality yet, the researches are still in laboratory scale and much work is still needed. The development of the growing use of technical engineering and molecular biology in the coming years, to obtain bio-compounds with improved properties and an expansion of scale of production is expected.

Keywords: Biotechnology, microbial lipase, biosurfactant, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*, industrial application.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotecnologia

Define-se biotecnologia como a aplicação de organismos, sistemas ou processos biológicos para a produção e/ou prestação de serviços para as indústrias. Verificou-se, então, a possibilidade de criação de uma nova indústria em que teria baixa demanda de energia por motivos como facilidade de adaptação dos micro-organismos a fontes de energias renováveis. Os micro-organismos podem ser usados em diversos setores, incluindo a produção de compostos químicos como o etanol por fermentação, cerveja com as leveduras, produção de enzimas e gêneros alimentícios (WISEMAN, 1983). Pode-se dizer que para haver sustentabilidade nas atividades industriais necessita-se, de substituição dos processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos bioquímicos que utilizem insumos renováveis, tendo a biocatálise industrial um papel central. Está claro que a apreciação do potencial biotecnológico depende de um entendimento completo das ciências básicas envolvidas. No entanto, é fácil identificar as áreas onde matérias-primas, incluindo resíduos de alimentos e agrícolas podem ser convertidos, cataliticamente, por micro-organismos ou enzimas produzidas por eles, para produtos benéficos e de maior valor agregado. Outra área inclui tratamento de resíduos, para evitar a poluição ambiental, no qual o crescimento dos micro-organismos (biomassa) pode ser usado como alimentação animal ou como fonte de compostos químicos como o metano. Portanto, toda a biotecnologia envolve a descoberta e subsequente otimização dos processos biológicos e bioquímicos necessários para explorar as fontes de matérias-primas naturais (BON, 2006).

1.2 Enzimas

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras em reações químicas que, dificilmente, aconteceriam na sua ausência. A capacidade catalítica das enzimas as tornam adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica e alimentícia (KIRK et al., 2002).

Enzimas microbianas são, frequentemente, mais usadas do que enzimas derivadas de plantas ou animais devido à sua ampla variedade de atividades catalíticas, possibilidade de alta produção, menor tempo para obtenção, facilidade de manipulação genética, padronização devido à falta de flutuações sazonais e boa adaptabilidade de crescimento dos micro-organismos em meios baratos. Além de ser mais estáveis que seus correspondentes em plantas e animais, as enzimas microbianas são mais convenientes e seguras (HASAN et al., 2006).

Lipases (EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas de larga ocorrência em plantas, animais e micro-organismos. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol e em condições com baixa quantidade de água, catalisar reações de transesterificação e esterificação. As lipases são estudadas há muitos anos devido, principalmente, às suas características de enantioseletividade, regioseletividade e quimioseletividade. Estas propriedades explicam o aumento da produção industrial nas duas últimas décadas (RATHI et al., 2001).

Lipases alcalinas receberam especial atenção, nestes últimos anos, devido ao seu potencial de aplicação na indústria, como na síntese de moléculas quirais, processamento de papel e fabricação de detergentes mais sofisticados. Além disso, elas podem ser um recurso

genético tanto para aplicação como para produção de peptídeos para secreção e promotores para a superprodução de enzimas (HORIKOSHI, 1999).

O renovado interesse nessa classe de enzimas é devido, primariamente, às crescentes investigações no uso de suas aplicações biotecnológicas. Lipases são compostos biocatalisadores, atuam em condições brandas, são altamente estáveis em solventes orgânicos, mostram ampla especificidade aos substratos e usualmente mostram alta regioseletividade e/ou estereoseletividade nas catálises (HASAN et al., 2006).

1.3 Fontes de lipases

Aproximadamente 107 anos atrás, o microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (JAEGER & EGGERT, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando-se diversos micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (HASAN et al., 2006). Hoje se conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipases. Entretanto, este número de micro-organismos conhecidos atinge apenas um percentual muito baixo da biodiversidade estimada dos micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas em geral e que ainda não foram caracterizados: cerca de 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos. Esta grande abundância de micro-organismos existentes na natureza torna importante o isolamento e a seleção de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (WUBBOLTS et al., 2000). As lipases de diferentes fontes (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) diferem grandemente em relação às propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de micro-organismos são as mais utilizadas, devido à sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las. Os fungos são

especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAEGER et al., 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas são estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

1.4 Biossurfatantes

Os biossurfatantes, de modo geral, podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros (como os ácidos ustilágico e corinomicólico) (ZAJIC et al., 1984), além de surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (DESAI & DESAI, 1993), sendo os lipopeptídeos os biossurfatantes mais efetivos (ZAJIC et al., 1984). Os surfatantes lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo melhores caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus* sp., incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina (MAIER, 2003), micosubtilisina e bacilomicina (STELLER & VATER, 2000). Esse tipo de composto se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a ácidos graxos, sendo que a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão frequentemente dispostos em uma estrutura cíclica (MAIER, 2003).

Os surfatantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia de hidrocarboneto enquanto a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfótera (DESAI & BANAT, 1997). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfatantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases com diferentes graus de polaridade (líquido/líquido ou gás/líquido). A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo esta uma propriedade única dos surfatantes. Esta propriedade torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfatantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões, detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BANAT, 2000a).

1.4.1 Surfactina

A surfactina é considerada um dos mais potentes biossurfatantes conhecidos, fazendo com que a tensão superficial da água reduza de 72 para 27 mN/m com uma CMC (concentração micelar crítica) em torno de 25 mg/L (Lang, 2002). A sua estrutura geral é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi, cuja cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes isoformas (KOWALL et al., 1998). Dentre os efeitos biológicos atribuídos ao lipopeptídeo surfactina, destaca-se a atividade antimicrobiana, antitumoral, antiviral (VOLLENBROICH et al., 1997a) e, recentemente, foram demonstradas aplicações como emulsificante, agente espessante e estabilizador de espuma (RAZAFINDRALAMBO et al., 1996).

1.5 Importância econômica

Após as proteases e carboidrases, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo baseado no total de volume de vendas. O uso comercial das lipases envolve bilhões de dólares e abrange uma enorme variedade de diferentes aplicações (JAEGER et al., 1999).

VAN BEILEN & LI (2002) publicaram que em 1998 a venda de enzimas, no mundo, foi superior a 1,5 bilhões de dólares, com um crescimento anual predito na taxa de 2% na indústria de couros a 15% na produção de papéis e 25% em enzimas de alimentos. Enzimas produzidas para uso doméstico alcançaram um crescimento de, aproximadamente, 10% do mercado total.

Em 2006, Bon apresentou dados referentes ao mercado mundial de enzimas, que é superior a 5 bilhões de dólares, sendo 2 bilhões de dólares o mercado de enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e 3 bilhões de dólares o de enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico e enzimas para química quiral).

O mercado brasileiro, em 2005, foi avaliado em US\$147,2 milhões (3% do mercado internacional), sendo que 20,6 milhões em exportações e 126,6 milhões, ou seja, 86% correspondem a importações considerando-se enzimas industriais e terapêuticas, medicamentos contendo enzimas e kits diagnósticos à base de enzimas, indicando grande desvantagem tecnológica e estratégica (BON, 2006).

A relação entre as quantidades e os valores de enzimas e preparações enzimáticas importadas e exportadas sugere a exportação de matéria-prima e a importação de produto já industrializado. O avanço da tecnologia enzimática no Brasil aumentará a sua representatividade comercial e econômica no cenário nacional e internacional e trará benefícios sociais e ambientais.

No caso dos biossurfatantes, a demanda por eles aumentou 300% na última década (BANAT et al., 2000) com uma produção mundial de 17 –19 milhões de ton/ano (DELEU & PAQUOT, 2004), o que representa uma generosa fatia deste mercado.

2 APLICAÇÕES

O benefício das lipases bacterianas no comércio e nas pesquisas origina-se de suas propriedades físicas e fisiológicas. As principais aplicações são: indústria de óleos e gorduras, produção de polímeros biodegradáveis, na indústria têxtil, na indústria de detergentes, em alimentos processados, produção de aroma e melhorador da qualidade, resolução de misturas racêmicas, ferramentas para diagnóstico, produtos de panificação e aromas de queijos, cosméticos, processamento de chá, aplicações na medicina, uso como biossensores, tratamento de couro, no tratamento de efluentes, biodegradação de óleos, indústria de papel e produção de biodiesel (HASAN et al., 2006).

Novas tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características (atividade, estabilidade, seletividade, especificidade) novas e mais direcionadas a 20 substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação de enzimas. Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (KRISHNA, 2002).

No caso dos biossurfatantes, as aplicações industriais envolvem as áreas de emulsionantes e dispersantes, solubilizantes, agentes molhantes, detergentes, agentes espumantes, espessantes, formadores de vesículas, fator de crescimento microbiano,

redutores de viscosidade, fungicida e agentes de recuperação (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A associação de enzimas com surfatantes sintéticos é estudada há algum tempo. Vários estudos reportam a melhora da atividade catalítica das enzimas com a adição de surfatante. Entretanto, não existem relatos de estudos com a utilização de enzimas e um biossurfatante de origem microbiana.

2.1 Aplicação de lipase na indústria de alimentos

As indústrias do gênero alimentício apresentam como característica um produto que, na maioria das vezes, possui uma composição química complexa, elevada atividade de água e pH próximo à neutralidade, tornando-se um ótimo meio para o desenvolvimento de micro-organismo. Estes micro-organismos podem ser patogênicos, colocando em risco a saúde do consumidor ou deteriorantes, diminuindo, dessa forma, a qualidade e o período de conservação dos alimentos (LEITÃO, 1995).

EXOJO (1995) enfatiza o fato de que a limpeza e a desinfecção sejam etapas básicas durante todo o processo produtivo, observando-se os seguintes passos: conter as medidas gerais obrigatórias a serem observadas durante o desenrolar dos trabalhos de limpeza e desinfecção; síntese clara das instruções específicas de execução para cada um dos funcionários de limpeza; descrição detalhada dos passos operativos para a limpeza e desinfecção de cada uma das salas, equipamentos, vestuários e demais elementos da instalação.

PLETT & GRAßHOFF (2007) destacaram que se deve atacar a sujidade sem degradar o suporte que a contém. Antes de escolher o detergente, deve-se considerar o material da superfície a ser limpa, tendo em vista a sua estabilidade química, mecânica e

térmica. A limpeza torna-se muito mais difícil quando a sujidade e a superfície apresentam comportamentos similares frente ao detergente. É importante considerar que a rugosidade da superfície poderá definir a área de adesão do biofilme, por isso é importante eliminá-la, sempre que possível, mediante um adequado plano de limpeza e desinfecção. O grau e tipo de sujidade possuem uma grande influência sobre a velocidade da limpeza. Uma sujidade seca é mais difícil de ser eliminada do que a mesma sujidade úmida e hidratada. A sua natureza deve ser muito bem observada antes de ser selecionado o detergente. As sujidades são classificadas em pigmentadas, lipídicas, proteínicas, corantes, óxido-metálicas e sais inorgânicos. No caso, a lipídica é formada por gorduras saponificáveis, eliminadas em meio aquoso e alcalino pela formação de sabão e insaponificáveis, atacáveis somente com solventes. No primeiro caso, enquadram-se as gorduras animais enquanto os óleos minerais situam-se no segundo caso.

Na indústria de carnes, o padrão de higiene a ser alcançado deve ser condizente com as condições e com o produto cárneo em fabricação. A desinfecção convencional pode ser insuficiente quando da elaboração de um produto cárneo fatiado ou indesejável na fabricação de produtos cárneos curados em que a flora natural desempenha importante papel no desenvolvimento das características sensoriais (TERRA, 2000).

Assim como na indústria de laticínios, onde a higiene influencia diretamente na qualidade do produto, podendo levar a alterações significativas nas propriedades sensoriais dos produtos. Desde a sua obtenção até o consumo, o leite fica exposto a uma série de influências de natureza físico-química e grande número de contaminações. Máquinas, utensílios de coleta e armazenamento, recipientes abertos em caso de ordenha manual são fontes de contaminação das mais significativas. Os grupos mais frequentemente isolados são os de micro-organismos termorresistentes e dos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter*.

De uma forma geral, a eficiência da limpeza dos equipamentos, o transporte de matéria-prima, os locais dentro da indústria, a distribuição e estocagem condicionam de forma direta as baixas contagens do leite, assegurando um produto de boa qualidade (TRONCO, 1997).

O detergente para a indústria alimentícia deve apresentar as seguintes características:

- umectante: reduz a tensão superficial, o que facilitará a penetração da solução de limpeza na sujidade;

- emulsificação: divide as partículas de lipídeos em pequenas gotículas, facilitando a sua remoção pela água;

- saponificação: reação química entre um álcali e um ácido graxo (insolúvel), formando um sabão (solúvel);

- peptização: divisão das proteínas em partículas menores;

- suspensão: as partículas de sujidades removidas são impedidas de se redepositarem nas superfícies;

- sequestro: reação com íons, inativando-os e facilitando a sua remoção;

- enxágue: remoção das emulsões ou soluções das superfícies por ação da água.

A definição de qual agente de limpeza ou desinfecção a ser utilizado, deve ser feita segundo as características apresentadas como ideais para esses grupos de produtos. Portanto, um bom produto higienizante deve conter componentes detergentes e de ação antimicrobiana, porque além de ser mais prático, demonstra maior eficiência, assegurando a qualidade dos produtos fabricados e a saúde/bem-estar do consumidor (PLETT & GRAßHOFF, 2007).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de enzimas alcalinas

Algumas lipases com altos níveis de atividade em pHs elevados são produzidas por vários micro-organismos. Isolados de *Pseudomonas thermotolerans* e *P. fragi* (WATANABE et al., 1977) apresentaram estabilidade numa faixa de pH 5 a 11 e pH ótimo em 9,5. ESSAMRI et al. (1998) relataram uma enzima produzida por *Rhizopus oryzae* que foi mais ativa em pH 8,5. Também em 1998, CHEN et al. publicaram a produção de uma lipase por *Acinetobacter radioresistens* que apresentou a atividade ótima em pH 10,0. O fungo *Penicillium aurantiogriseum* produziu uma lipase na qual foi estável numa faixa de pH entre 6,0 a 9,0 e o ótimo em pH 8,0 (LIMA et al., 2004). A lipase de *Citrobacter freundii* teve uma máxima atividade em pH 9,0 (GUNASEKARAN et al., 2006). MACEDO et al. (1997) selecionaram o fungo *Geotrichum* sp. dentre 600 micro-organismos como o melhor produtor de lipase. A enzima produzida foi caracterizada com alta atividade lipolítica na faixa de pH entre 7,5 e 9,0 e temperatura de 45°C. Já em 2006, PRAZERES et al. selecionaram o fungo *Fusarium oxysporum* linhagem 152B, como um bom produtor de lipase alcalina extracelular, apresentando um pH ótimo em 8,0 e temperatura ótima a 50°C.

3.2 Estabilidade enzimática

Alguns estudos foram realizados visando a otimização de processos para aumentar a produção de lipase alcalina em detergentes. RATHI et al. (2001), encontraram uma nova lipase alcalina de *Burkholderia cepacia*, utilizando vários parâmetros físico-químicos para otimizar a produção máxima desta enzima. O meio de crescimento para a produção da lipase era composto de óleo de mostarda (1%, v/v) a 50°C, pH 7,0 e 250 rpm. A lipase alcalina foi compatível com vários surfatantes iônicos e não-iônicos, bem como com

detergentes comerciais. A enzima manteve 100% de atividade na presença de oxidantes fortes (1%, v/v ou 1%, m/v), água oxigenada, perborato de sódio e hipoclorito de sódio após 1 h de tratamento à temperatura ambiente. A enzima foi, também, resistente a várias proteases alcalinas comerciais, restando sua completa atividade após 1 h de tratamento a 50°C. A lipase exibiu melhor estabilidade em detergentes comerciais e agentes oxidantes quando comparada à Lipolase® (Novozymes).

3.3 Produção de biossurfatantes por micro-organismos

Surfactina, um poderoso biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* com alto poder de redução da tensão superficial foi relatado por ARIMA et al. (1968) utilizando meio sintético. Após este, vários outros estudos foram feitos. Com o propósito de tornar o processo mais viável financeiramente e dar um destino a um efluente potencialmente tóxico ao meio ambiente, SANTOS et al. (1999) e NITSCHKE et al. (2003) empregaram a manipueira como meio de cultura para a produção de biossurfactante utilizando uma cepa de *Bacillus subtilis*. A manipueira, rica em compostos cianogênicos e compostos orgânicos (CEREDA 2005), é um subproduto gerado em grande volume no processamento de farinha de mandioca. COSTA (2005) a utilizou como substrato para a produção do biossurfactante em fermentador de bancada e, posteriormente, utilizada por BARROS (2007) para a produção em escala de planta piloto.

3.4 Aplicação de enzimas em soluções detergentes

O campo de aplicação mais importante comercialmente para lipases hidrolíticas é sua adição em detergentes, os quais são usados principalmente em lavanderias domésticas e industriais e em lava-louças domésticas. O poder de limpeza dos detergentes parece já ter

atingido o auge; todos os detergentes são muito similares e são baseados nos mesmos mecanismos de ação. Para melhorar o poder de detergência, modernos sabões em pó e detergentes para equipamentos automáticos contêm uma ou mais enzimas como proteases, amilases, celulasas e lipases (ITO et al., 1998).

Um especial problema associado à limpeza de roupas é a remoção de manchas de gorduras. Desta forma, sujeira contendo gordura é emulsionada e removida usando uma combinação de elevada temperatura e alcalinidade. Entretanto, há uma forte tendência do uso de baixas temperaturas na lavagem, próximas a 40°C condições particularmente insuficientes para a remoção de gorduras. Há desta forma uma necessidade de incluir aditivos em detergentes, como enzimas, que sejam efetivos em baixas temperaturas de lavagem, estáveis em soluções altamente alcalinas e sob condições extremas da composição do detergente (GERRITSE et al., 1998).

Uma boa base para a discussão é dividir o processo de limpeza em três passos: *i*) transporte do agente de limpeza na fase aquosa à superfície manchada; *ii*) interação da molécula de surfatante na mancha e a diminuição da energia de adesão da mancha sólida; *iii*) transporte e dispersão da mancha deslocada na fase aquosa (SCHLUSSLER, 1976).

TATARA et al. (1985), relataram que a lipase de *Candida cylindracea* e de *Mucor sp.* apresentaram excelentes habilidades de hidrólise de gordura sob condições alcalinas e baixa temperatura, sugerindo uma possível utilização em sistemas detergentes. FUJII et al. (1986), descreveram que a adição de lipase de *Candida cylindracea*, em sistemas detergentes, melhora em 15 a 20% a remoção de azeite de oliva impregnado em tecidos de algodão. XIA et al. (1996), mostraram que a adição de lipase produzida pelo *Penicillium cyclopium* var. *album* (PG 37) em formulações detergentes melhora sua detergência em torno de 20% sugerindo que essa lipase pode potencialmente melhorar a ação de

detergentes sintéticos. HEMACHANDER et al. (2000) relataram que a adição de lipase de *Ralstonia pickettii* melhorou a remoção de gordura de tecidos de algodão de 24 a 27% como um aditivo a dois detergentes comerciais sob condições ótimas, além de mostrar que a lipase pode ser seguramente usada como um aditivo em formulações detergentes. SAISUBRAMANIAN et al. (2006) estudaram a eficácia da lipase de *Aspergillus niger* MTCC 2594 como um aditivo em formulações detergentes usando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Sob condições ótimas, a remoção de azeite de oliva de tecidos de algodão foi de 33% (25°C) e 17,1% (49°C) maior na presença de lipase do que no tratamento contendo apenas detergente, mostrando que a enzima pode ser empregada em formulações para a remoção de triglicerídeos tanto em condições a frio como a quente.

3.5 Utilização de biossurfatantes na indústria de detergentes

Nos últimos anos, surfatantes naturais de origem microbianas, conhecido como biossurfatantes, têm recebido muito mais atenção comparado com os surfatantes sintéticos devido às suas características de menor toxicidade, biodegradabilidade, efeitos anti-irritante e a compatibilidade com a pele (VELIKONJA & KOSARIC, 1993; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; MAIER, 2003). Além disso, devido à presença de um ou mais grupos funcionais, centros quirais, baixa concentração micelar crítica, maior atividade superficial e boa capacidade de formar cristais líquidos, os biossurfatantes oferecerem vantagens distintas sobre os surfatantes sintéticos altamente utilizados, sendo portanto considerados surfatantes superiores aos sintéticos (RAZAFINDRALAMBO et al., 1998; FINNERTY, 1994; NITSCHKE et al., 2004). Surfatantes microbianos exibem elevada especificidade e, conseqüentemente, estão adaptados às novas aplicações como evidenciado por numerosos relatos publicados durante a última década sobre a aplicação de biossurfatantes em diversos

setores industriais (BANAT et al., 2000; CAMEOTRA & MAKKAR, 2004) e na proteção do ambiente (BANAT, 1995; DAS et al., 2008). Apesar disso, uma busca na literatura mostrou que o uso dos biossurfatantes como substitutos dos tensoativos nos detergentes para lavanderia, raramente foi explorado.

Estudos anteriores mostraram que duas cepas de *Bacillus subtilis* (DM-03 e DM-04), isoladas de dois *habitats* extremamente diferentes, são produtoras eficientes de biossurfatantes lipopeptídicos cíclicos (CLP) sob condições de crescimento termofílicas. Estes biossurfatantes CLP possuem algumas propriedades vantajosas, tais como a redução da tensão superficial da água, formação de micelas e uma capacidade de solubilizar um grande número de compostos hidrofóbicos (MUKHERJEE & DAS, 2005). Além disso, eles são seguros para os organismos aquáticos, particularmente peixes (MUKHERJEE et. al., 2006), que os tornam bons candidatos para aplicação nos detergentes de lavanderias, podendo ser substituídos por surfatantes sintéticos. Mais recentemente, foi avaliada a compatibilidade e estabilidade do biossurfatante cíclico CLP em detergentes e verificaram a melhora no processo de lavagem de tecidos na presença do tensoativo. Foi evidente a melhora na remoção de gordura (9-14%) e manchas de sangue (23-26%) de tecidos de algodão quando se utilizou o biossurfatante no sistema de lavagem (MUKHERJEE, 2007).

3.6 Remoção de gordura de superfícies rígidas

Com o propósito de investigar “*in vitro*” o comportamento das enzimas frente às condições nas indústrias de alimentos, CHATEAU et al. (2004) relataram um novo teste para avaliar a eficiência da limpeza de superfícies duras sem ação mecânica. Os autores utilizaram uma mistura de gorduras sobre uma placa de aço inox e uma solução detergente com surfatantes sintéticos. Os parâmetros escolhidos foram temperatura, concentração das

soluções detergentes e agitação. O teste foi fácil de executar, teve alta sensibilidade, e pode ser adaptado para resolver problemas encontrados pelos formuladores de detergentes.

Alguns outros trabalhos avaliaram técnicas de limpeza de superfícies rígidas. Em 1988, BÄCKSTRÖM & ENGSTRÖM estudaram a remoção de gordura de policloreto de vinila (PVC) por surfatantes sintéticos. Fatores como a concentração micelar crítica (CMC) do surfatante, o comprimento da cadeia do surfatante, o pH, a temperatura e a agitação foram analisados. Eles concluíram que o processo de limpeza envolve muitos passos consecutivos ao nível molecular e as medidas forneceram informações interessantes sobre o mecanismo de limpeza.

3.7 Ação antimicrobiana/antiviral

Durante o processamento e a manipulação de alimentos, estes estão sujeitos à contaminação de natureza química, física e microbiológica, sendo esta última a que provoca os maiores problemas para as indústrias de alimentos e seus consumidores. Segundo dados do “Food and Drug Administration” (FDA), agência que regulamenta os setores de alimentos e medicamentos nos Estado Unidos da América, aproximadamente dois terços das etiologias confirmadas de toxi-infecções veiculadas por alimentos estão diretamente associadas a contaminações microbiológicas ocorridas em indústrias, principalmente de origem bacteriana (FDA, 1997).

As propriedades antimicrobianas dos biossurfatantes são grandemente pesquisadas. Elas ocorrem na natureza em diversos grupos de moléculas compreendendo glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, fosfolipídeos e polímeros (MUKHERJEE et al., 2006). Entre os lipopeptídicos, a surfactina produzida pelo *B. subtilis* é o primeiro e mais bem conhecido antimicrobiano (ARIMA et al., 1968). Uma cepa de *Bacillus*

circulans, isolada de ambiente marinho, foi identificada como produtora de surfactina que apresentou uma potente atividade antimicrobiana contra micro-organismos gram-negativos, gram-positivos e linhagens resistentes a multi-drogas (MDR) (DAS et al., 2008).

O efeito biológico ligado à surfactina tem sido estudado desde a década de 60 (ARIMA et al., 1968). Mais recentemente, BATRAKOV et al. (2003) publicaram a produção de um lipopeptídeo cíclico de uma nova linhagem de *Bacillus licheniformis* 603 e testaram seu efeito antimicrobiano frente a vários micro-organismos, apresentando atividade inibitória de crescimento, principalmente, contra *Corynebacterium variabilis* e *Acinetobacter* sp. BENINCASA et al. (2004) isolaram uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LB1 que produziu um biossurfactante com boa atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris* (CIM: 8 mg/L), *Streptococcus faecalis* (4 mg/L), *Pseudomonas aeruginosa* (32 mg/L) e, também, contra os fungos fitopatogênicos *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Gliocadium virens* e *Chaetomium globosum* (32 mg/L). NITSCHKE (2004) relatou a ação antimicrobiana da surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* LB5a produzido em manipueira e concluiu que todas as bactérias testadas foram susceptíveis ao lipopeptídeo. Dentre as bactérias gram-negativas, a *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais sensível ao produto e, entre, as gram-positivas foram o *Micrococcus luteus* e o *Bacillus cereus*. COSTA (2005) investigou a CIM (Concentração Mínima Inibitória) da surfactina do *Bacillus subtilis* LB5a contra diversas bactérias. Os ensaios evidenciaram a ação antibacteriana do surfactante contra todas as cepas testadas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, sendo que para o *Enterococcus faecium* e o *Micrococcus luteus* os valores de CIM foram menores de 1 mg/mL.

A surfactina também é conhecida pelo seu efeito sobre a integridade da membrana lipídica com a formação de canais de íons, sugerindo que ela se torne um promissor antibiótico (CARILLO et al., 2003). VOLLENBROICH et al. (1997b) estudaram o efeito deste lipopeptídeo sobre o nível de proliferação e as mudanças morfológicas dos micoplasmas contaminantes em células de mamíferos. Nas concentrações de 12,5 e 25 μ M de surfactina houve mudanças de permeabilidade na membrana dos micoplasmas, sendo que com 50 μ M uma completa desintegração das membranas foi observada. Micoplasmas são agentes causadores de uma série de doenças em animais e humanos como a inflamação respiratória aguda (pneumonia), doenças do trato urogenital, entre outras. Eles são parasitas de células eucarióticas, sendo considerados uns dos maiores contaminantes que afetam os tecidos celulares.

Com a surfactina produzida pela cepa de *Bacillus subtilis* LB5a, ficou demonstrado que o biossurfatante foi capaz de inibir a infectividade “*in vitro*”, em sistemas de culturas celulares, dos vírus VSIV (vírus da estomatite vesicular de bovinos), na concentração de 12,5 μ M e no caso do MHV-3 (vírus da hepatite murina) a concentração inibidora foi 5 μ M (NITSCHKE, 2004).

3.8 Remoção de biofilmes de superfícies rígidas

Nas indústrias de alimentos, o aço inoxidável é largamente empregado em plantas e instalações por apresentar características como: resistência às temperaturas baixas e altas, resistência à corrosão, baixa migração iônica, superfície lisa e pouco porosa, o que dificulta a aderência e retenção de micro-organismos, e a neutralização em relação aos alimentos, impedindo que as propriedades organolépticas dos alimentos sejam alteradas (GÂNDARA & OLIVEIRA, 2000; STEINER et al., 2002).

Nos procedimentos de desinfecção em indústrias, um desinfetante deve ser efetivo e uma concentração apropriada deve ser aplicada. Uma concentração muito diluída do desinfetante aumenta o risco de contaminação do alimento e da aquisição de resistência do micro-organismo ao desinfetante (LUPPENS et al., 2002).

Os biofilmes são definidos como uma comunidade sésil de organismos, caracterizadas por células que estão irreversivelmente aderidas a uma superfície, interface ou entre si, embutidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por estes micro-organismos e que apresentam um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (DONLAN & COSTERTON, 2002). Substratos com superfícies hidrofílicas, como a superfície de aço inoxidável, muito utilizada em instalações, equipamentos e dispositivos, permitem uma grande adesão bacteriana (SINDE & CARBALLO, 2000; CHMIELEWSKI & FRANK, 2003).

Os desinfetantes mais utilizados na desinfecção de superfícies e equipamentos de indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem os princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988). Os compostos quaternários de amônio são sanitizantes surfatantes catiônicos efetivos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e bolores (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003).

Numerosas pesquisas sustentam o conceito de que bactérias aderidas são mais resistentes aos biocidas do que organismos em suspensão. Testes recentes sobre a eficácia de desinfetantes estão sendo direcionados às bactérias aderidas em superfície e crescidas como um biofilme (LECHEVALIER et al., 1987; LECHEVALIER et al., 1988; FRANK & KOFFI, 1990; DE BEER et al., 1994; EGINTON et al., 1998; FATEMI & FRANK, 1999;

TRACHOO & FRANK, 2002; SOMERS & WONG, 2004; CHAVANT et al., 2004; BERRANG et al., 2008). RONNER & WONG (1993) mostraram que o cloro e os desinfetantes aniônicos foram mais capazes de remover *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. de superfícies de aço inoxidável do que os compostos quaternários de amônio.

Muitos pesquisadores apostam em medidas preventivas para a contaminação de agentes patogênicos. Recentes estudos sugerem uma nova estratégia, baseada no biocondicionamento de superfícies por meio de compostos produzidos por certos micro-organismos, os biossurfatantes, por exemplo, o rhamnolipídeo de *P. fluorescens* (MEYLHEUC et al., 2006a; MEYLHEUC et al., 2006b) e a surfactina de *B. subtilis* (II et al., 2001). Entretanto, já houve relatos de que o condicionamento de aço inoxidável por biossurfatantes pode acarretar numa maior sensibilidade à corrosão da superfície (DAGBERT et al., 2008).

Biossurfatantes, apesar de suas características de promover a alteração de sistemas aquosos, reduzindo a tensão superficial e interfacial e, conseqüentemente, funcionando como um bom dispersante e emulsificante. Adicionando-se a isso, o fato de sua propriedade de interferir na barreira membranal de micro-organismos, ainda não despertou interesse por grande parte dos pesquisadores, para sua utilização como sanitizante. Quimicamente ele ainda contribui por ser uma molécula biodegradável e não trazendo nenhum prejuízo ao meio ambiente.

4 CONCLUSÃO

O uso de micro-organismos ou produtos do seu metabolismo como nova opção para processos já estabelecidos alcança grande notoriedade no campo tecnológico. Enzimas são, atualmente, muito atrativas devido ao seu potencial biotecnológico. Produzidas por micro-organismos, elas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações industriais. O campo de aplicações para as lipases estende-se na área médica, indústria de alimentos, aplicações domésticas e industriais como detergentes e aplicações ambientais. Biossurfatantes são produtos do metabolismo de micro-organismos e tem como principal característica a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de sistemas líquido-gás ou líquido-líquido imiscíveis, respectivamente. Eles apresentam, ainda, outras funções tais como emulsificante, agente molhante, antibacteriana e antitumoral. A produção deste composto, também, está voltada para a utilização de resíduos do processamento industrial abundante e muito barato.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.
2. BÄCKSTRÖM, K.; ENGSTRÖM, S. Removal of triglycerides from hard surfaces by surfactants: an ellipsometry study. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 3, p. 412-420, 1988.

3. Banat, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource and Technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.
4. BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.
5. BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 198, n. 1, p. 44-47, 2000.
6. BARROS, F. F. C. **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. Campinas, 2007, 102p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
7. BATRAKOV, S. G. et al. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1634, n. 3, p. 107-115, 2003.
8. BENINCASA, M. et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2004.
9. BERRANG, M. E.; FRANK, J. F.; MEINERSMANN, R. J. Effect of chemical sanitizers with and without ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a biofilm within polyvinyl chloride drain pipes. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 66-69, 2008.

10. BON, E. P. S. Mercado brasileiro interno e externo de enzimas industriais e especiais. In **VII SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA – ENZITEC**, Brasil, Caxias do Sul, 2006.
11. BURKERT, J. F. M. et al. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61-67, 2005.
12. CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.
13. CARILLO, C. et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1611, n. 1-2, p. 91-97, 2003.
14. CEREDA, M. P. Produtos e subprodutos. Em **Processamento e utilização da mandioca**. Souza, L. S.; Farias, A. R. N.; Mattos, P. L. P.; Fukuda, W. M. G. eds., Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Cruz das Almas, 2005, cap 1.
15. CHATEAU, M. E. et al. A new test for cleaning efficiency assessment of cleaners for hard surfaces. **Journal of Surfactants and Detergents**, n. 7, v. 4, p. 355-362, 2004.
16. CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; HÉBRAUD, M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. **FEMS Microbiological Letters**, v. 236, n. 1, p. 241-248, 2004.
17. CHEN, S.; CHENG, C.; CHEN, T. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, n. 86, v. 3, p. 308-312, 1998.

18. CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Institute of Food Technologists**, v. 2, n. 1, p.22-32, 2003.
19. COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. Campinas, 2005, 87p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
20. DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M-N. Pit formation on stainless steel surfaces pre-treated with biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 1, p. 35-40, 2008.
21. DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN. R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 104, v. 6, p. 1675-1684, 2008.
22. D'ANNIBALE, A. et al. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.
23. DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4339-4344, 1994.
24. DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 6-7, p. 641-646, 2004.
25. 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.
26. DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

27. EGINTON, P. J. et al. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 101-105, 1998.
28. ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, v. 8, p. 711-713, 1998.
29. ERTUGRUL, S.; DÖNMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 720-724, 2007.
30. ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 97-103, 1998.
31. EXOJO, G. G. Limpieza y desinfección: etapa básica en el proceso de producción. In: **Alimentación**. Madrid, 1995, p. 97-101.
32. FATEMI, P.; FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracetic sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.7, p. 761-765, 1999.
33. FDA. Food and Drug Administration. Food Code: recommendations of the United States Public Health Service, **United States Department of Health a Human Services**, Washington, 1997.
34. FINNERTY, W. R. Biosurfactants in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 291-295, 1994.

35. FRANK, J. H.; KOFFI, R. A surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v. 53, n.7, p. 550-554, 1990.
36. FUJII, T.; TATARA, T.; MINAGAWA, M. Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency I. Effects of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 6, p. 796-799, 1986.
37. GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2000.
38. GERRITSE, G.; HOMMES, R. W. J.; QUAX, W. J. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2644-2651, 1998.
39. GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3-4, p. 111-120, 2006.
40. GUNASEKARAN, V.; KOTAY, S. M.; DAS, D. Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, n. 6, p. 485-491, 2006.
41. HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, v. 2, p. 235-251, 2006.
42. HEMACHANDER, C.; PUVANAKRISNAN, R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 809-814, 2000.

43. HORIKOSHI, K., Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 735-750, 1999.
44. II, J. R. M.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5848-5854, 2001.
45. ITO, S. et al. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 185-190, 1998.
46. JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.
47. JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
48. KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.
49. KOWALL, M. et al. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 204, v. 1, p. 1-8, 1998.
50. KRISHNA, S.H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 1, p. 239–267, 2002.
51. LANG, S. Biological amphiphiles (microbial surfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 1-2, p. 12-20, 2002.
52. LECHEVALIER, M. W.; BABCOCK, T. M.; LEE, R. G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2714-2724, 1987.

53. LECHEVALIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R.G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 649-654, 1988.
54. LEITÃO, M. F. F. Controle microbiológico da qualidade no processamento industrial de bovinos. In: **Ciência e Tecnologia da Carne Bovina**. CTC/ITAL, Campinas, 1995, p. 89-106.
55. LIMA, V. M. G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.
56. LIN, S. C. Biosurfactant: recents advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 1996.
57. LUPPENS, S. B. I. et al. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4194-4200, 2002.
58. MACEDO, G. A.; PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strains of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 2, p. 90-95, 1997.
59. MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances Applied in Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 101-121, 2003.
60. MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.
61. MALDONADO, R. R.; POZZA, E. L.; COSTA, F. A. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of lipase production by *Geotrichum candidum* using

- alternative nitrogen sources. Artigo submetido a revista **Bioresource Technology** em 2006.
62. MEYLHEUC, T.; RENAULT, M.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 71-78, 2006a.
63. MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactant produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 128-137, 2006b.
64. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº15 de 23 de agosto de 1988: Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de setembro de 1988.
65. MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, n.1, p. 479-489, 2005.
66. MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.
67. MUKHERJEE, A. K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 330-335, 2007.
68. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfatantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

69. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, n. 1-3, p. 295-302, 2003.
70. NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; COSTA, G. N.; GILIOLI, R.; MEURER, E. C.; GATTI, M. S. V.; EBERLIN, M. N.; HÖEHR, N. F.; PASTORE, G. M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596, 2004.
71. NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biossurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. Campinas, 2004, 88p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
72. PLETT, E. A.; GRAßHOFF, A. Cleaning and sanitation. In: **Handbook of Food Engineering**. Heldman D. R.; Lund, D. B.; 2 ed., CRC Press, New York, 2007, p.929-975.
73. PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509, 2006.
74. RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187-192, 2001.
75. RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; BANIEL, A.; POPINEAU, Y.; HBID, C.; JACQUES, P.; THONART, P. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide

- biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 149-151, 1996
76. RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; DELEU, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; THORNAT, P.; PAQUOT, M. Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 911-916, 1998.
77. RONNER, A.; WONG, A. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.
78. SAISUBRAMANIAN, N. et al. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 669-676, 2006.
79. SANTOS, C. F. C.; PASTORE, G. M.; DAMASCENO, S.; CEREDA, M. Produção de biossurfatante por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 157-161, 1999.
80. SCHLUSSLER, H. J. **Brauwissenschaft**, v. 29, n. 1, p. 263, 1976.
81. SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000.
82. SOMERS, E. B.; WONG, A. C. L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a

- variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2218-2229, 2004.
83. STEINER, A. E.; MARAGOS, M. M.; BRADLEY, R. L. JR. Cleanability of stainless steel surface with various finishes. **Dairy Food Environ Sanitation**, v. 20, n. 1, p. 250-260, 2002.
84. STELLER, S.; VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. **Journal of Chromatography B**, v. 737, n. 267-275, 2000.
85. TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495-1502, 2004.
86. TATARA, T. et al. Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency II. Evaluation of adaptability of various kinds of lipases in practical laundry conditions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 62, n. 6, p. 1053-1058, 1985.
87. TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. Ed. Unisinos, São Leopoldo, 2000, 216 p.
88. TRACHOO, N.; FRANK, J. F. Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1117-1121, 2002.
89. TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Ed. UFSM, Santa Maria, 1997, 166 p.
90. VAN BAILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

91. Velikonja, N.; Kosaric, N. Biosurfactants in food application In: **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 16.
92. VOLLENBROICH, D. et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, n. 3, p. 289-297, 1997(a).
93. VOLLENBROICH, D. et al. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44-49, 1997(b).
94. WATANABE, N. et al. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural Biology Chemical**, v. 41, n. 8, p. 1353-1358, 1977.
95. WISEMAN, A. **Principles of Biotechnology**. Surrey University Press USA: Chapman & Hall, New York, 1983. 211 p.
96. XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, I. A. Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 1, p. 115-120, 1996.
97. ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W., PANCHAL C. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 87-107, 1983.

Capítulo 2

**Functional and physicochemical characterization of the
mixture of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* 152B
and biosurfactant from *Bacillus subtilis* LB5a.**

**Functional and physicochemical characterization of the mixture of alkaline lipase
from *Fusarium oxysporum* 152B and biosurfactant from *Bacillus subtilis* LB5a.**

Cedenir Pereira de Quadros, Francisco Fábio Cavalcante Barros
and Gláucia Maria Pastore*

Departament of Food Science, State University of Campinas - UNICAMP, Monteiro
Lobato 80, PO Box: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: cdquadros@yahoo.com.br

Phone: +55 19 3521 4090

Fax: + 55 19 6521 3887

Artigo a ser submetido à Revista Journal of Surfactants and Detergents

CAMPINAS, 2009

Abstract

The effect of different treatments on activity of alkaline lipase (AL) from *Fusarium oxysporum* 152B and the surface activity of the biosurfactant (BS) produced by *Bacillus subtilis* LB5a in a mixture of them were characterized for the evaluation of their potential for industrial applications. The alkaline lipase was stable in the range of 0.0001-0.001% (w/v) of the biosurfactant and in 0.01% the enzyme was more active. AL/BS mix was stable from -4 to 30°C during 24 h and in a pH range of 6-10 during 48 h. The critical micelle concentration of the biosurfactant was not altered in the presence of the lipase. The lipase remained unaltered in the presence of diverse compounds and was improved in the presence of ammonium persulphate, ascorbic acid, sodium citrate and sodium benzoate, except in the presence of CuSO₄. Regarding the biosurfactant, only FeCl₃ negatively affected its tensoactive property. In the presence of hydrocarbons, the mixture presented a high emulsifying index, except for octane, decane and diesel. The emulsifying index was approximately 60% and remained stable up to 96 h with vegetable oils, except for babassu oil. All these properties and the resistance during the treatments made the AL/BS mix a potential adjuvant for the detergent, pharmaceutical and food industries.

Keywords: Lipase characterization; Microbial surfactant; *Fusarium oxysporu*; *Bacillus subtilis*;

Abbreviations: AL, alkaline lipase; AL/BS mix, alkaline lipase and biosurfactant mixture; BS, biosurfactant; CMC, critical micelle concentration; CMD, critical micelle dilution; EI, emulsifying index; FFA, free fat acids; LAS, linear alkylbenzene sulfonate; ST, surface tension; RU, residual activity; U, enzymatic activity.

1 Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) are a group of enzymes that occur widely in nature [1]. Their biological function is to catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to free fatty acids, di, monoacylglycerols and glycerol and, in low moisture conditions, shift reaction equilibrium to synthesis [2]. The recent interest in these bioproducts is due to their biotechnological applications, as they are catalysts that do not need cofactors, with ample substrate specificity, stability in organic solvents, as well as being active in mild reaction conditions [3].

Microbial enzymes are the most used ones due to the possibility of to obtain high production yields, the possibility of genetic modification, absence of seasonal fluctuations and rapid growth of microorganisms on inexpensive media [4]. This makes the improvement of existing technologies possible, as well as the development of new applications [5]. This development permits the application of lipases in the fats and oils, biodegradable polymer, textile, detergent, food, flavor, racemic mixture resolution, diagnosis tools, cosmetic, medicine, biosensors, leather treatment, effluent treatment, oil biodegradation, paper and biodiesel industries [6].

Notwithstanding the great number of possible applications, lipases with high activity in alkaline pH are especially selected for the detergent industry. Since the 90s, industries such as Novo Nordisk and Genencor International have produced them for this application [3]. Various microorganisms are reported as producers of promising enzymes for this market: *Pseudomonas thermotolerans* and *P. fragi* [7], *Rhizopus oryzae* [8], *Penicillium aurantiogriseum* [9], *Citrobacter freundii* [10] and *Fusarium oxysporum* 152B [11].

Lipases are the third greatest group in sales volume in enzyme market [12]. In 1998, the world market for enzymes was greater than US\$ 1.5 billion, with an annual growth of 2% in the leather industry, 15% in paper and 25% in food. Domestic use represents approximately 10% of the market [13]. According to the Business Communications Company, Inc., the global market for industrial enzymes increased from US\$ 2.2 billions in 2006 to an estimated value of US\$ 2.3 billions at the end of 2007, with the possibility of reaching US\$ 2.7 billions in 2012 at an average annual growth rate of 4% [Thakore, 2008; www.bccresearch.com/report/treport.php?rcode=BIO030E&type=scope].

The search for new associations to potentate the effect of lipases in a formulation is becoming more frequent and surfactants are good adjuvants. Various studies report improvement of catalytic activity of enzymes with the addition of anionic, cationic and non-ionic surfactants [14-17]. However, the presence of synthetic surfactants can cause environmental problems with toxic effects on living organisms [18]. Considering this aspect, microbial surfactants or biosurfactants present themselves as an alternative as their biodegradable character [19], low toxicity [20, 21], stability to rigorous treatments and high emulsifying capacity [20] are known. Nevertheless, studies involving the characterization of a mixture of enzymes of microbial origin and a biosurfactant have not yet been reported.

Surfactin is one of the most potent surfactants known, reducing the surface tension of water from 72 to 27 mN.m⁻¹ at low critical micellar concentrations [22]. Its general structure is that of a cyclic peptide of seven amino acids linked to a β -hydroxy fatty acid chain, with 13 to 15 carbon atoms, permitting the existence of different isoforms [23]. Within its biological functions are antimicrobial [24], antitumor, antiviral [25] and lipid membrane destabilizing [26] activities, as well as demonstrated applications as emulsifier, thickening agent and foam stabilizer [27].

The objective of this work was to investigate the functional properties and the stability of both alkaline lipase (AL) from *Fusarium oxysporum* 152B and biosurfactant (BS) from *Bacillus subtilis* LB5a, used in association and submitted to different treatments and conditions, aiming at their application in several industrial fields.

2 Materials and methods

2.1 Strains

Fusarium oxysporum 152B was previously isolated from fruits and soils of Brazilian Northeast and kept at 4°C in potato dextrose agar tubes [11]. *Bacillus subtilis* LB5a from Biochemistry Laboratory Culture Collection [28] was maintained on nutrient agar (Difco) slants at 4°C. For maintained of the cultures, both were sub-cultured every 3 months.

2.2 Alkaline lipase (AL) production

The *F. oxysporum* 152B was cultivated for 96 h at 30°C in a YMA medium containing (g.L⁻¹): peptone 5.0, glucose 10.0, malt extract 3.0, yeast extract 3.0, agar 20.0. One piece of 2 cm² from this culture was transferred to a 250 mL Erlenmeyer flasks with 20 mL of liquid medium, containing (g.L⁻¹): olive oil 10.0, peptone 15.0, yeast extract 5.0, K₂HPO₄ 3.0, MgSO₄.7H₂O 0.4, pH 6.0; homogenized with a T18 basic ultra-turrax homogenizer (IKA[®] Works, Inc., USA) and incubated at 30°C, 160 rpm for 24 h (pre-inoculum). For the lipase production, 1 mL of this inoculum was transferred to 50 mL of fresh medium and incubated for more 96 h in the same conditions. The fermented medium was chilled to 4°C and the supernatant, separated from the mycelia by gauze filtration, was fractionated with ammonium sulphate at 80% saturation. After centrifugation at 9.500 × g (J2-21, Beckman

Centrifuge, USA), the so-called dried extract was prepared after dialyzing the precipitate against distilled water at 4°C and lyophilizing the solid matter [11].

2.3 Biosurfactant (BS) production

The *B. subtilis* LB5a was inoculated in a cassava wastewater as culture medium. The fermentation was carried out in a pilot bioreactor (8000 MP80, New Brunswick Sci., USA) under the following conditions: temperature 35°C, agitation 150 rpm and aeration 15 L.h⁻¹. The biosurfactant produced was recovered from medium by foam formed during the fermentation. The isolated from liquefied foam was carried out by precipitation in pH 2.0 using 6 N HCl and keeping it at 4°C overnight and centrifuged. The biosurfactant was extracted from precipitated with chloroform/methanol 65:15 and dried [29].

2.4 Alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix)

Before each assay, the lyophilized enzyme was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and the biosurfactant was dissolved in distilled water. After that, the mixture was made and kept in refrigerated conditions until the use.

2.5 Assay of lipase activity

Lipase activity (U) was determined by titration using: 5 mL of olive oil emulsion (olive oil and 7% arabic gum solution [25:75; v/v] homogenized for 3 min), 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 1 mL of enzyme suspension. The conditions of the assays were 30°C, 160 rpm for 30 min in a rotator bath (C 76, New Brunswick Sci., NJ, USA). The reaction was immediately stopped after the reaction period by the addition of 15 mL acetone:ethanol mixture (1:1; v/v). The released free fatty acids (FFA) were titrated against

50 mM NaOH. It was used a standard curve of oleic acid *versus* 50 mM NaOH on the same conditions for the calculation. The U was expressed as $\mu\text{mols of released FFA} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ of enzymatic suspension ([30] adapted).

2.6 Surface activity measurement

Surface tension (ST) was determined using tensiometer (K-12, Krüss Processor Tensiometer, Hamburg, Germany) with the Wilhelmy plate method. It were used 10 mL of sample at room temperature $\sim 20^{\circ}\text{C}$ [31].

2.7 Critical micelle dilution (CMD) measurement

CMD⁻¹ and CMD⁻² were done by measuring the surface tension, according to above described using a 10-times and 100-times diluted solution of biosurfactant in distilled water [29, 32].

2.8 Effect of biosurfactant on enzymatic activity

The U of AL/BS mix, containing 1 mg.mL^{-1} of lipase, was measured in presence of different concentrations of biosurfactant. The activity was expressed as residual activity (RU%) in relation to the free-surfactant assay.

2.9 Effects of temperature on AL/BS mix stability

AL/BS mix were maintained at -5 , 4 , 30 and 60°C for 12, 24 and 48 h. Samples were colleted at each time, the temperature was adjusted to 30°C for 30 min and the U, ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² were measured. The U was expressed as residual activity in relation to initial time. Solutions containing only lipase or biosurfactant were used as control groups.

2.10 Effects of pH on AL/BS mix stability

AL/BS mix was maintained at 5°C for 12, 24 and 48 h on pH values ranging from 6 to 12. Samples were collected at each time, adjusted to 30°C for 30 min and U, ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² were measured. The U was expressed as residual activity in relation to initial time. Solutions containing only lipase or biosurfactant were used as control groups.

2.11 Critical micelle concentration (CMC) measurement

Serial dilutions were prepared from 1 mg.mL⁻¹ of each compound of the AL/BS mix. A solution containing only BS was used as control [29, 33].

2.12 Effects of inorganic salts and others compounds on AL/BS mix activity

The salts: Na₂CO₃, NaCl, CaCl₂, KCl, CuSO₄, MnCl₂, FeCl₃; the oxidizing agents: hydrogen peroxide (H₂O₂), ammonium persulphate [(NH₄)₂S₂O₈], potassium iodide (KI); the reducing agents: ascorbic acid and 2-mercaptoethanol; the chelating agents: sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇) and EDTA; the food preservatives: sodium propionate (0,32%, w/v) and sodium benzoate (0,1%, w/v) were evaluated on AL/BS mix activity. Each compound had the final concentration adjusted to 1 mM in the final reaction.

2.13 Emulsification activity

Six milliliter of different hydrocarbon (pentane, benzene, hexane, octane, decane, toluene, diesel and gasoline) or vegetables oils: cottonseed (*Gossypium hirsutum*), babassu (*Attalea speciosa*), sesame seed (*Sesamum indicum*), sunflower seed (*Helianthus annus*), corn (*Zea mays*), olive (*Olea europaea*) and soybean (*Glycine max*) were mixed to 4 mL of an aqueous solution of AL/BS mix (1mg.mL⁻¹ of each compound), in a screw cap tube, and vortexed at high speed for 2 min. The emulsion stability was determined each 24 h, and the

emulsifying index (EI %) was calculated by dividing the height of emulsion layer by the total mixture height and multiplying by 100 [34].

2.14 Statistical analysis

The mean value and respective standard error for each replicate were calculated by the software Microsoft® Excell 2000. The Tukey test was performed using the software SAS® System for Windows (SAS Institute Inc. Release 8.02 TS Level 02M0), considering a *p*-value of 5%.

3 Results and discussion

3.1 Effect of biosurfactant concentration on enzymatic activity

The effect of biosurfactant concentration on the activity of alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B is shown in Table 1.

Table 1. Effect of different biosurfactant concentrations on alkaline lipase¹ enzymatic activity².

Biosurfactant (%)	Residual Activity ³ (UR %)	ST ⁴ (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-1;4} (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-2;4} (mN.m ⁻¹)
Biosurfactant-free	100.0 ± 9.1 ^{b,c}	---	---	---
0.0001	92.0 ± 4.9 ^c	39.27	50.42	60.26
0.001	103.9 ± 6.8 ^{a,b}	36.80	50.36	66.37
0.01	113.2 ± 7.9 ^a	32.14	40.07	52.81
0.1	40.2 ± 5.2 ^d	30.57	31.96	35.98

1) Alkaline lipase from *F. oxysporum* concentration was fixed in all assays (1 mg.mL⁻¹).

2) Lipase activity was carried out at 30°C, 160 rpm for 30 min using olive oil emulsion.

3) UR values: average ± standard deviations of two repetitions in triplicate. Averages that have no common letters are significantly different (*p*<0.05).

4) ST (superficial tension), CMD⁻¹, CMD⁻² (critical micelle dilution) have standard deviations of 10 measurements ≤ 0.2.

At concentrations in the range from 0.0001 to 0.001% of biosurfactant, the enzyme not presented significant difference ($p < 0.05$) in its performance, when compared to the biosurfactant-free assay (control). However, there was an increase of, in average, 13.2% at the 0.01% concentration, nevertheless, at higher tensoactive concentrations (0.1%) the enzyme had its activity reduced to 40.27% in comparison to the control.

This same behavior was described for lipase from *Penicillium cyclopium* var. *album* PG37 in the presence of the synthetic surfactants as SDS, laurate and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) [14] and for lipase from *Yarrowia lipolytica* (YLLIP2) and *Thermomyces lanuginosus* (TLL) with sodium taurodeoxycholate, SDS and Triton X-100 [17].

Enzyme inhibition began in the presence of detergent monomers (below the CMC) and maximum inhibition occurs in the presence of micelles. The authors reported that the inhibition provoked by the detergent is due to the prevention of the binding of the enzyme to the substrate. An alternative explanation is that detergent monomers might form complexes with lipase by interaction with the hydrophobic surface and that these complexes can be solubilized in the aqueous phase [17].

Various factors influence enzymatic activity: (i) changes in protein ionic groups, (ii) changes in lipase conformation and, (iii) consequently, changes in lipase surface activity, according to Kawase *et al.* (1985) [14]. Another activation/inhibition mechanism can be explained by complex formation. Anionic surfactants, such as SDS, probably interact at low concentrations with proteins forming a complex, which becomes more active than the isolated lipase, as it could act more efficiently on the substrate. But at high concentrations the excess of surfactant could induce conformational changes or influence the active site of the enzyme and cause inhibition [35].

Various studies have reported the inhibitory power of anionic surfactants on lipases, as occurs with the enzyme from *Bacillus* sp. in the presence of deoxycholate [36] and with the lipase from *Mucor* sp. in the presence of Triton X-100, SDS and deoxycholate [37]. SDS and n-lauryl sarcosine strongly inhibited the enzyme from *Aspergillus carneus*, leading to almost total inhibition [38], while alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B had its activity reduced to 2.39% in the presence of SDS [11].

The result obtained for the lipase from *F. oxysporum* 152B in association with the biosurfactant from *B. subtilis* LB5a presented the same behavior as other enzymes with synthetic surfactants reported in literature. As there are no reports of the association of lipases with biosurfactants, we correlated our results with those obtained with anionic synthetic surfactants.

3.2 Effect of temperature on LA/BS stability

In the temperature range from -4 to 30°C, the enzyme was practically stable during all the storage period. The treatments had not present significant difference in relation to the control group ($p < 0.05$), but only slightly decreasing values as a function of temperature can be observed. When the mixture was stored at 60°C, the enzyme practically lost all its activity in the first 12 hours (Table 2), in accordance with results already found by other researchers [11].

Table 2. Effect of temperature on enzymatic stability, ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² of the AL/BS mix¹

Time (h)	Temperature (°C)	Residual Activity ^{2,3} (UR %)	ST ⁴ (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-1,4} (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-2,4} (mN.m ⁻¹)
	Control	100.0 ± 8.4 ^{a,b}	---	---	---
12	-4	99.9 ± 10.5 ^{a,b}	29.80	31.35	37.54
	5	97.2 ± 8.6 ^{a,b}	29.85	31.62	38.01
	30	96.6 ± 8.4 ^{a,b}	29.76	31.42	38.32
	60	8.0 ± 5.0 ^c	29.9	31.56	38.16
24	-4	110.3 ± 9.6 ^a	30.06	31.06	38.41
	5	99.3 ± 7.9 ^{a,b}	29.45	31.19	38.11
	30	92.2 ± 7.9 ^b	29.95	31.66	37.89
	60	---	29.63	31.87	38.22

- 1) Lipase (1 mg.mL⁻¹) and biosurfactant (0.01%) concentrations were fixed in all assays.
- 2) Lipase activity was carried out at 30°C, 160 rpm for 30 min using olive oil emulsion.
- 3) UR values: average ± standard deviations of two repetitions in triplicate. Averages that have no common letters are significantly different ($p < 0.05$).
- 4) ST (superficial tension), CMD⁻¹, CMD⁻² (critical micelle dilution) have standard deviations of 10 measurements ≤ 0.2.

These authors incubated the enzyme from *F. oxysporum* 152B for 1 hour at temperatures from 30 to 80°C and verified that it maintained its activity only when stored at temperatures below 60°C. Temperature did not affect the biosurfactant of the mixture, with ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² similar to those already obtained in previous work [29].

3.3 Effect of pH on LA/BS stability

At pH 6.0 there was an increase in enzyme activity by the action of the biosurfactant. In all other ranges there was a significant reduction of enzymatic activity, except at pH 10 (12 h) where a 15% increase was observed (Table 3).

Table 3. Effect of pH on enzymatic stability, ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² of the AL/BS mix¹.

Time (h)	pH	Residual Activity ^{2,3} (UR%)	ST ⁴ (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-1,4} (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-2,4} (mN.m ⁻¹)
Control		100.0 ± 16.2 ^{b,c}	---	---	---
12	6	157.2 ± 12.3 ^a	32.02	35.90	51.96
	8	94.5 ± 9.1 ^c	31.54	37.87	49.30
	10	116.6 ± 9.3 ^b	35.11	38.30	49.30
	12	15.8 ± 4.4 ^e	34.85	39.51	52.30
24	6	117.0 ± 10.2 ^b	31.98	37.33	53.21
	8	71.0 ± 9.3 ^d	31.43	37.19	50.58
	10	69.9 ± 8.0 ^d	35.15	37.62	54.14
	12	---	35.35	40.09	53.35
48	6	117.4 ± 6.3 ^b	32.05	37.50	52.90
	8	82.3 ± 9.5 ^{c,d}	31.49	37.50	50.33
	10	69.5 ± 7.3 ^d	35.20	38.11	34.00
	12	---	35.01	40.10	53.22

1) Lipase (1 mg.mL⁻¹) and biosurfactant (0.01%) concentrations were fixed in all assays.

2) Lipase activity was carried out at 30°C, 160 rpm for 30 min using olive oil emulsion.

3) UR values: average ± standard deviations of two repetitions in triplicate. Averages that have no common letters are significantly different ($p < 0.05$).

4) ST (superficial tension), CMD⁻¹, CMD⁻² (critical micelle dilution) have standard deviations of 10 measurements ≤ 0.2.

Various reports show the high stability of lipases at different pH values, as for the enzymes from *Bacillus* sp. RSJ-1 [36], *Acinetobacter radioresistens* [39] and *F. oxysporum* 152B [11]. With respect to the biosurfactant, the surface tension is close to 30 mN.m⁻¹ in the pH range between 6.0 and 8.0 and from pH 10.0 the ST increases to approximately 35 mN.m⁻¹, indicating the beginning of property loss at more extreme pH values. This is due to the fact that extreme pH values cause biosurfactant precipitation, altering its properties and, consequently, increasing ST. This phenomenon has already been observed for the lipopeptide from *B. subtilis* C9 [40] and *B. subtilis* LB5a grown on cassava wastewater [29, 41].

3.4 Effect of alkaline lipase on critical micellar concentration

Biosurfactant surface activity is not altered with the addition of the enzyme, indicating that the structure of the lipopeptide is not susceptible to enzymatic action (Fig. 1).

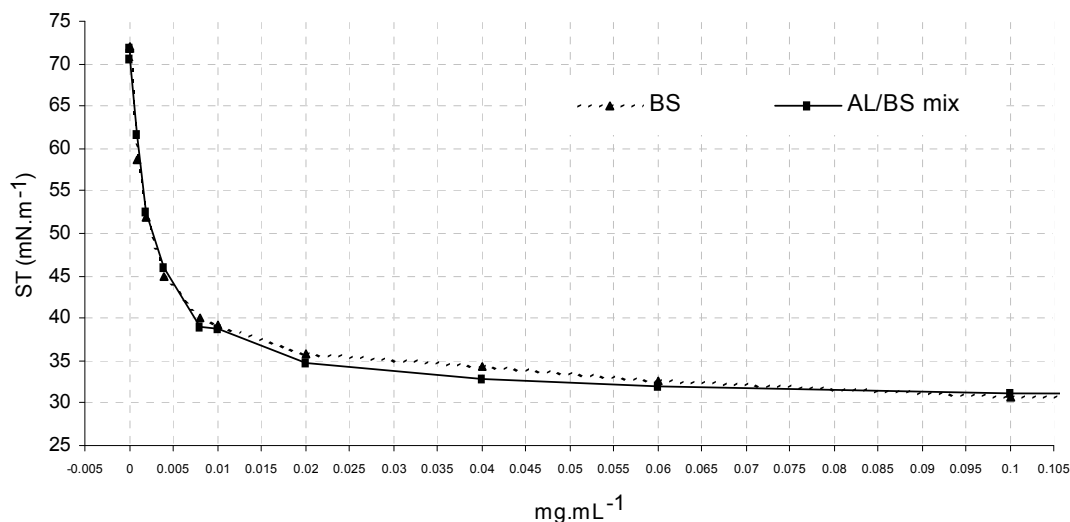


Figure 1. Critical micelle concentration (CMC) determination of biosurfactant from *B. subtilis* LB5a (BS) and alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) through ST (superficial tension) measurements of successive dilutions.

The concentration value that corresponds to the inflexion point of the curve is the same for both solutions, with or without enzyme, that is, approximately 0.01 mg.mL⁻¹. CMC values in the range of 10 to 14 mg.L⁻¹, quite close to those determined in this study, were found by other authors [28, 29, 33].

3.5 Effect of ions, oxidizing, reducing, chelating and preservative agents

The effect of different compounds on AL/BS mix activity is shown in Table 4. The presence of Na⁺, both from Na₂CO₃ as from NaCl, on the AL/BS mix did not cause a significant change in U in comparison to the control, data similar to those described for

lipases from *Mucor hiemalis f. hiemalis* [42] and *Aspergillus carneus* [38], where Na^+ had a very mild inhibitory effect on the enzyme. The values found by these researchers are within the standard deviations presented in this study.

Ca^{2+} and Mn^{2+} ions also presented a slight inhibitory effect on the hydrolytic action of the AL/BS mix, of approximately 4 and 6%, as was observed for the lipases from *P. aurantiogriseum* [9], *Pseudomonas* sp. KWI-56 [43] and *A. oryzae* [44]. Cu^{2+} ion presented a strong inhibitory effect, reducing enzyme activity around the 54%. Some studies have reported a pronounced loss of activity for the enzymes from *Pseudomonas* sp. KWI-56 (99%) [43] and *Acinetobacter* sp. RAG-1 (37%) [45].

On the other hand, K^+ ion presented a stimulating effect on U, as observed for the lipase isolated from *Pseudomonas* sp. [46] and for the lipase from *B. coagulans* BTS-3 [47].

Fe^{3+} ion did not present an effect on U, with a value practically the same as the control. This result is different to those already presented by other authors, who found that the enzymes were strongly inhibited in the presence of this ion [43, 48, 49], reaching total loss of activity in one case [37].

Regarding tensoactive activity of the AL/BS mix, except for FeCl_3 that increased ST, CMD^{-1} and CMD^{-2} of the system to 52.96, 65.11 and 69.34 mN.m^{-1} , respectively, all other measurements remained practically unchanged in all saline treatments, in accordance with the data reported recently [29].

The behavior of surfactin in the presence of different inorganic salts has been studied. The authors reported that the surfactin-divalent cation (0.01 mM Ba^{2+} and Ca^{2+}) complex increased the molecular surface of the surfactant on the air-water surface due to the association between two or more surfactin molecules by the salt bridge; this

modification favored micelle formation by the tensoactive agent. Monovalent salts (Li^+ , Na^+ , K^+) on carboxylic groups of surfactin caused rigidity of the molecule leading to a smaller spatial conformation. As well as presenting a strong effect on the CMC of surfactin, reducing it 4 to 12 times, the ion-surfactin complexes increased erythrocyte haemolysis at low salt concentrations. This conformational change did not alter surface tension values, which remained between 27.5 and 31.5 mN.m^{-1} [50].

The enzyme was practically stable in the presence of hydrogen peroxide, presenting approximately 95% residual activity. This result is in agreement with the data presented for alkaline lipase from *Bacillus* A30-1 [51]. Another study with lipase from *Burkholderia cepacia* presented 100% residual activity after 1 hour treatment at room temperature [2] and lipase from *Bacillus* sp. RSJ-1 was stable in low concentrations of hydrogen peroxide (0.1 to 0.2%) [36].

In the presence of ammonium persulphate and potassium iodide, the lipase from *F. oxysporum* 152B presented an increase in activity of 12.14 and 5.13%, respectively. This is different to the lipase from *Bacillus* sp. RSJ-1, which presented a decrease in activity in the presence of 1 mM ammonium persulphate (72%) and potassium iodide (47%) [36]. Knowing that cleaning products contain bleaching oxidizing agents in their formulations, the discovery of new enzymes which are stable in the presence of these agents is of great commercial value.

Table 4. Effect of different compounds on enzymatic activity, ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² of the AL/BS mix¹⁾.

Compounds ²⁾	Residual Activity ^{3),4)} (UR %)	ST ⁵⁾ (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-1,5)} (mN.m ⁻¹)	CMD ^{-2,5)} (mN.m ⁻¹)
Control	100.0 ± 8.2 ^{c,d,e}	31.38	36.85	64.48
<i>Inorganics salts</i>				
Na ₂ CO ₃	90.8 ± 11.7 ^e	38.20	44.07	57.92
NaCl	97.4 ± 7.2 ^{c,d,e}	31.40	36.18	57.91
CaCl ₂	96.5 ± 6.9 ^{c,d,e}	29.76	33.19	54.55
KCl	105.0 ± 11.7 ^{b,c,d,e}	31.07	35.47	58.46
CuSO ₄	45.6 ± 11.7 ^f	34.55	47.63	62.94
MnCl ₂	93.4 ± 10.7 ^{d,e}	29.18	32.26	60.47
FeCl ₃	101.5 ± 9.1 ^{c,d,e}	52.96	65.11	69.34
<i>Oxidizing agents</i>				
H ₂ O ₂	95.3 ± 3.2 ^{c,d,e}	31.86	40.46	72.59
(NH ₄)S ₂ O ₈	112.1 ± 5.1 ^{a,b,c}	29.76	42.01	67.42
KI	105.1 ± 5.8 ^{b,c,d,e}	30.64	39.64	68.69
<i>Reducing agents</i>				
Ascorbic acid	127.2 ± 5.9 ^a	39.97	40.12	62.55
2-mercaptoethanol	99.4 ± 4.9 ^{c,d,e}	30.51	39.59	67.96
<i>Chelating agents</i>				
Sodium citrate	121.5 ± 5.6 ^{a,b}	30.95	43.80	64.83
EDTA	102.5 ± 10.5 ^{c,d,e}	31.31	39.36	61.57
<i>Food preservatives</i>				
Sodium propionate	109.4 ± 5.6 ^{b,c,d}	31.77	40.25	68.04
Sodium benzoate	120.1 ± 7.2 ^{a,b}	30.96	38.99	59.48

1) Lipase (1 mg.mL⁻¹) and biosurfactant (0.01%) concentrations were fixed in all assays.

2) Tested compounds (1 mM) concentrations were fixed in all assays, except for sodium propionate (0.32%) and sodium benzoate (0.1%).

3) Lipase activity was carried out at 30°C, 160 rpm for 30 min using olive oil emulsion.

4) UR values: average ± standard deviations of two repetitions in triplicate. Averages that have no common letters are significantly different ($p < 0.05$).

5) ST (superficial tension), CMD⁻¹, CMD⁻² (critical micelle dilution) have standard deviations of 10 measurements ≤ 0.2.

The stability of the mixture was also tested in the presence of reducing agents. In the presence of ascorbic acid, activity increased in the range of 27.2% and with 2-mercaptoethanol there were no changes in activity. Other studies also report the stability of

microbial enzymes, as lipases from *Mucor* sp. [37] and *A. carneus* [38], in the presence of 2-mercaptoethanol. However, it has already been reported that the lipase from *Bacillus* sp. RSJ-1 lost approximately 26 and 36% of its activity in the presence of ascorbic acid and 2-mercaptoethanol, respectively [36].

As reported that the enzyme from *M. hiemalis f. hiemalis* presented 102% of its activity with EDTA and the authors suggested that the enzyme studied is not characterized as being a metalloenzyme [42], the lipase from *F. oxysporum* 152B present in the AL/BS mix presented a pronounced improvement in activity in the presence of sodium citrate, and a slighter improvement with EDTA. This behavior is similar to the enzyme from *Bacillus* sp. RSJ-1, which did not undergo drastic changes when incubated with chelating agents such as sodium citrate and EDTA [36].

Benzoates and propionates are commonly used in the food industry as preservatives. The AL/BS mix was tested in the presence of these preservatives and was unaltered in the presence of sodium propionate and had an activity gain of approximately 20% in the presence of sodium benzoate. The ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² remained constant. However, the alkaline lipase from *A. carneus* presented 89% and 45% residual activity in the presence of sodium propionate and benzoate, respectively [38].

3.6 Emulsification capacity

Figure 2 shows the emulsifying index (EI%) of the different hydrocarbons using the AL/BS mix during 24, 48, 72 and 96 hours.

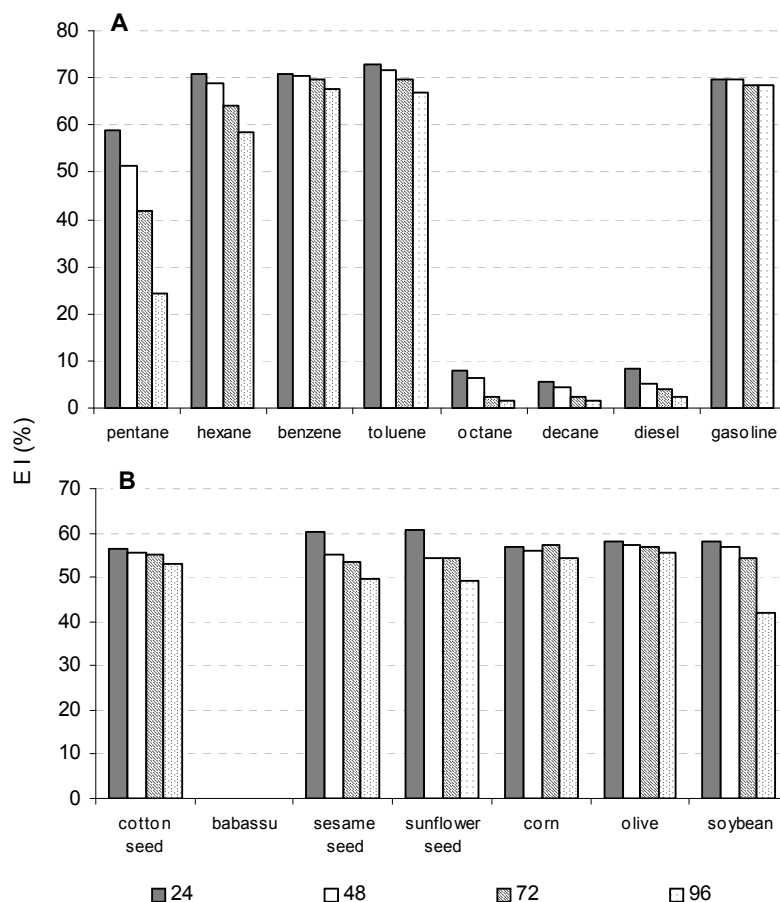


Figure 2. Emulsifying index (EI %) of different hydrocarbons (A) and vegetable oils (B) with the alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) as emulsifier.

In Figure 2(A), it can be observed that the hydrocarbons hexane, benzene, toluene and gasoline present high EI, especially in the first 24 hours ($\geq 70\%$), and remain relatively stable up to 96 hours. Other hydrocarbons, such as octane, decane and diesel had EI values below 9% already in the first 24 hours. The hydrocarbon with the least stable emulsion was pentane, which presented a 34.56% reduction of its emulsion during the period of the experiment. In comparison to the EI obtained with the use of the tensoactive agent alone

[29], the addition of lipase to the biosurfactant improved the emulsifying index of the hydrocarbon toluene, which was approximately 31.2% with the tensoactive agent, to 72% levels using AL/BS mix. However, with octane, decane and diesel the EI fell from 71.9, 59.5 and 58.6, respectively, to values below 9%. Other compounds had similar behavior. With respect to the vegetable oils (Figure 2B), in general, all presented EI values in the range of 60% in the first 24 h and were relatively stable up to 96 h, when the EI was approximately 50%. These results are very similar to those found testing the same oils with the biosurfactant alone [29]. Sesame seed oil was more stable (EI of 49.4%) with the AL/BS mix than with the biosurfactant alone (29%); however, soybean oil was less stable (42%) and babassu oil did not emulsify using the mixture. The mixture showed potential for possible application with edible oils, especially oils with unsaturated fatty acids of approximately 18 carbons in their composition, but more research must be carried out in this area.

4 Concluding remarks

In this work, a novel association between alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B and biosurfactant from *B. subtilis* LB5a is presented. As shown in the assays, this mixture was highly stable when tested in several physical and chemical treatments. The enzyme was stable in the presence of up to 0.01% of surfactant, but as already reported in the literature, had its activity reduced in higher concentrations (Table 1). However, we believe that this new mixture can have a successful and broad potential for applications in various branches of industries such as food, chemical and pharmaceutical.

5 Acknewlegments

The authors wish to thank the financial support received from the National Research and Development Council (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq).

6 References

- [1] Wong, D. W. S., Lipase, in: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (Ed.), *Handbook of Food Enzimology*, New York: Marcel Dekker Inc; 2003, pp. 667-680.
- [2] Rathi, P., Saxena, R. K., Gupta, R., A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.* 2001, 37, 187-192.
- [3] Jaeger, K-E., Reetz, M. T., Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, 396-403.
- [4] Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 39, 235-251.
- [5] Snellman, E. A., Colwell, R. R., *Acinobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnology potencial. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 31, 391-400.
- [6] Gandhi, N. N., Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 621-634.
- [7] Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y., Yamada, K., Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 1977, 41, 1353-1358.
- [8] Essamri, M., Deyris, V., Comeau, L., Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. Biotechnol.* 1998, 60, 97-103.
- [9] Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., Fontana, J. D., Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents.

Biochem. Eng. J. 2004, 18, 65-71.

[10] Gunasekaran, V., Kotay, S. M., Das, D., Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. *Indian J. Exp. Biol.* 2006, 44, 485-491.

[11] Prazeres, J. N., Cruz, J. A. B., Pastore, G. M., Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol.* 2006, 37, 505-509.

[12] Jaeger, K-E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53, 315-351.

[13] van Bailsen, J. B., Li, Z., Enzyme technology: an overview. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 338-344.

[14] Xia, J., Chen, X., Nnanna, I. A., Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 115-120.

[15] Mogensen, J. E., Sehgal, P., Otzen, D. E., Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry* 2005, 44, 1719-1730.

[16] Sonesson, A. W., Elofsson, U. M., Brismar, H., Callisen, T. H., Adsorption and mobility of a lipase at a hydrophobic surface in the presence of surfactants. *Langmuir* 2006, 22, 5810-5817.

[17] Aloulou, A., Puccinelli, D., De Caro, A., Leblond, Y., *et al.*, A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1771, 1449-1456.

[18] Cserháti, T., Forgács, E., Oros, G., Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ. Int.* 2002, 28, 337-348.

- [19] Mulligan, C. N., Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 2005, 122, 183-198.
- [20] Cameotra, S. S., Makkar, R. S., Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 50, 520-529.
- [21] Flasz, A., Rocha, C. A., Mosquera, B., Sajo, C., A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *Med. Sci. Res.* 1998, 26, 181-185.
- [22] Lang, S., Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2002, 7, 12-20.
- [23] Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T. *et al.*, Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 204, 1–8.
- [24] Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., Ortiz, A., Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1611, 91-107.
- [25] Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R. M., *et al.*, Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* 1997, 25, 289–297.
- [26] Heerklotz, H., Seelig, J., Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophys. J.* 2001, 81, 1547-1554.
- [27] Razafindralambo, H., Popineau, Y., Deleu, M., Hbid, H., *et al.*, Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 911-916.
- [28] Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G. M., Selection of microorganisms for biosurfactant

production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.* 2004, 35, 81-85.

[29] Barros, F. F. C., Ponezi, A. N., Pastore, G. M., Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35, 1071-1078.

[30] Macedo, G. A., Park, Y. K., Pastore, G. M., Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Rev. Microbiol.* 1997, 28, 90-95.

[31] Ramé, E., The interpretation of dynamic contact angles measured by the Wilhelmy plate method. *J. Colloid. Interface Sci.* 1997, 185, 245-251.

[32] Makkar, R. S., Cameotra, S. S., Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microb. Biotech.* 1997, 18, 37-42.

[33] Sheppard, J. D., Mulligan, C. N., The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1987, 27, 110-116.

[34] Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53, 224-229.

[35] Pocalyko, D. J., Tallman, M., Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani* pisi cutinase. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 22, 647-651.

[36] Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R.M., Gupta, L. K., *et al.*, Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem.* 2002, 37, 1075-1084.

[37] Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L., Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 2002, 31, 968-975.

- [38] Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A., Giri, B., Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem.* 2003, 39, 239-247.
- [39] Chen, S., Cheng, C., Chen, T., Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J. Ferment. Bioeng.* 1998, 86, 308-312.
- [40] Kim, H-S., Yoon, B-D., Lee, C-H., Suh, H-H., *et al.*, Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, 84, 41-46.
- [41] Nitschke, M., Pastore, G. M., Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 336-341.
- [42] Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D., Comeau, L., Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 25, 80-87.
- [43] Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T., Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Bio. Chem.* 1990, 54, 1253-1258.
- [44] Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K., *et al.*, Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995, 59, 1199-1203.
- [45] Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R., Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 5771-5779.
- [46] Gao, X., Cao, S., Zhang, K., Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 74-82.

- [47] Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., *et al.*, Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression Purif.* 2005, 41, 38-44.
- [48] Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., *et al.*, Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 759-763.
- [49] Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F-M., *et al.*, Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification and characterization. *Protein Expression Purif.* 2001, 22, 388-398.
- [50] Thimon, L., Peypoux, F., Michel, G., Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14, 713-718.
- [51] Wang, Y., Srivastava, K., Shen, G-J., Wang, H. Y., Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *J. Ferment. Bioeng.* 1995, 79, 433-438.

Capítulo 3

An innovative mixture for detergent formulation: alkaline
lipase and biosurfactant.

An innovative mixture for detergent formulation: alkaline lipase and biosurfactant

Cedenir Pereira de Quadros*, Janaína Nicanuzia dos Prazeres and Gláucia Maria Pastore

Department of Food Science, School of Food Engineering, Unicamp, PO Box 6121,
Campinas, São Paulo, 13083-862, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: cdquadros@yahoo.com.br

Phone: +55 19 3521 4090

Fax: + 55 19 6521 3887

Artigo a ser submetido à Revista Process Biochemistry

Campinas

2009

Abstract

In recent years, detergent manufacturers have placed increasingly efficient products on the market. With the aim of contributing to this trend, the present study evaluated an innovative mixture of bioproducts. Alkaline lipase (*AL*) from *Fusarium oxysporum* and biosurfactant (*BS*) from *Bacillus subtilis* were assessed for their interaction with synthetic anionic surfactants (linear alkyl benzene sulphonate–LAS, sodium dodecyl sulphate–SDS and sodium deoxycholate–BL), while the cleaning action of *AL/BS* mixtures were appraised for their ability to remove oil from cotton fabrics. The stability of the lipase was higher in the presence of *BS* than in that of anionic surfactants. For all the concentrations tested, the residual activity (RU%) of the lipase was an average 98% with 0.1% *BS*, with no significant differences from the control group ($p < 0.05$) being observed. However, with 0.1% SDS, LAS or BL, lipase activity was significantly inhibited in relation to the control group ($p < 0.05$). In aqueous systems, oil removal from cotton fabrics increases as the *AL* or *BS* concentration increases. In this study, oil removal reached 48% in the presence of 0.5 mg.mL⁻¹ of alkaline lipase and 50% in the presence of 3 mg.mL⁻¹ of biosurfactant. For the system containing 0.5 mg.mL⁻¹ of lipase, adding 3.0 mg.mL⁻¹ of *BS* increased fat removal by 10%, thus demonstrating the synergistic effect of the mixture. The behavior of the *AL/BS* mix was similar to that of systems containing surfactants such as SDS or LAS. Since the present research points to innovative applications for microbial products considered environmentally friendly, the results presented herein should encourage future studies.

Keywords: Oil removal, Alkaline lipase, Biosurfactant, *F. oxysporum*, *B. subtilis*, Cotton fabrics, Enzymatic detergent, Microbial surfactant.

Abbreviations: *AL*, alkaline lipase from *F. oxysporum*; *AL/BS mix*, alkaline lipase and biosurfactant mixture; *BL*, sodium deoxycholate; *BS*, biosurfactant from *B. subtilis*; *LAS*, sodium linear alkylbenzene sulphonate; *SDS*, sodium dodecyl sulphate; *U*, enzymatic activity; *RU%*, residual activity.

Introduction

The current trend in laundry cleaning is to use low temperatures for both environmental and economic reasons. This makes it essential to use enzymes in detergent products (Flipsen et al., 1998).

One of the most persistent problems in laundry cleaning is how to remove fat stains. Although fat-containing dirt can be emulsified and subsequently removed via a combination of high temperatures and high-alkalinity washing products, such conditions lead to fabric damage and require substantial energy inputs. At lower wash temperatures, (e.g., 40°C), fat-stain removal is limited and requires the addition of lipases (Gerritse et al., 1998).

The cleaning power of detergents has apparently peaked. All detergents contain similar ingredients and all are based on similar mechanisms. For stronger cleaning power, modern heavy-duty powder detergents and automatic dishwasher detergents generally contain one or more enzymes, such as protease, amylase, cellulase or lipase (Ito et al., 1998).

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of triacylglycerols into monoglycerides, diglycerides, free fatty acids and glycerols; at low temperatures, they catalyze a reverse reaction (Rathi et al., 2001). In the detergent industry, the importance of lipases is that they serve to remove fat residues during low-temperature

washing (30-60°C). The lipases used should be compatible with the detergent formulations (pH between 10 and 11, in accordance with the chemical composition of detergents and organic solvents).

In 1994, Novo Nordisk introduced the first commercial lipase: Lipolase®, derived from the fungus *T. lanuginosus* and denominated *A. oryzae*. Then, in 1995, two bacterial lipases were introduced: Lumafast® from *Pseudomonas mendocina* and Lipomas® from *P. alcaligenes*, both produced by Genencor International (Hasan et al., 2006).

Lipolytic enzymes from various microorganisms have since been discovered, and most of these enzymes are suitable for detergent applications. The use in detergent formulations of some of the lipases generated from microorganisms has been described in Japanese patents, such as those referring to *Chromabacterium* sp. (Minoguchi et al., 1989) and *Candida* sp. (Nishioka et al., 1990). Similar applications have been shown to exist for lipases from *Candida cylindracea* and *Mucor* sp. (Tatara et al., 1985), *Candida cylindracea* (Fujii et al., 1986), *Penicillium cyclopium* var. *album* (PG 37) (Xia et al., 1996), *Ralstonia pickettii* (Hemachander & Puvanakrishnan 2000) and *Aspergillus niger* MTCC 2594 (Saisubramanian et al., 2006).

Microbial surfactants are molecules which, in low concentrations, are capable of altering the surface tension of a liquid-gas system or the interfacial tension of a liquid-liquid system (Arima et al., 1968). These functions reflect the amphiphilic chemical structure of surfactants, which are characterized by a polar group and an apolar aliphatic chain (Lang, 2002). In recent years, surfactants of microbial origin, known as biosurfactants, have become more attractive than synthetic surfactants due to their low toxicity, biodegradability, skin compatibility (Makkar & Cameotra 2002; Maier 2003) and stability under rigorous conditions (Barros et al., 2008a; Barros et al., 2008b). Moreover,

since biosurfactants have one or more functional groups, they are characterized by their ability to form micelles, low critical micelle concentrations (CMC) and high surface activity (Peypoux et al., 1999), all of which properties are held to be superior to those of the corresponding synthetic compounds. Biosurfactants have a wide range of applications in the environmental (Holmberg, 2001) and various other sectors (Mulligan, 2005). They are therefore coming to substitute synthetic compounds, which are acutely toxic for aquatic species and are not biodegradable (Cserháti et al., 2002). The use of a biosurfactant produced from *B. subtilis* has recently been evaluated as a substitute for synthetic compounds in detergent formulations (Mukherjee, 2007).

Several studies have concluded that adding surfactants improves the catalytic activity of enzymes. To date, however, no research involving the interaction of biosurfactants and microbial enzymes has been reported. In the present study, an alkaline lipase from *F. oxysporum* was analyzed in the presence of a biosurfactant from *B. subtilis* and of several commercial anionic surfactants. Furthermore, during the washing process, the removal of a soiling agent (olive oil) from cotton fabrics was monitored in the presence of a lipase/biosurfactant mixture.

Experimental Procedures

Strains

Fusarium oxysporum was previously isolated from Brazilian fruits (Prazeres et al., 2006) and *Bacillus subtilis* was isolated from soils (Nitschke et al., 2004). The two wild strains are maintained in the Bioflavor Laboratory at UNICAMP and both are subcultured at 3-month intervals.

Materials

The olive oil used for the lipase assay was Azeite Gallo (Victor Guedes, Ind. e Com., S.A., Portugal). All the chemicals and media components used in the analysis were of the highest grade purity commercially available.

Production of alkaline lipase (AL)

F. oxysporum was cultivated at 30°C for 96 h in a medium consisting of (w/v): peptone 0.5%, glucose 1.0%, malt extract 0.3%, yeast extract 0.3% and agar 2.0%. One-cm² blocks of the agar containing *F. oxysporum* were then transferred into 100-mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of liquid medium with (w/v) olive oil 1%, peptone 1.5%, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.04% and pH 6.0. In these flasks, they were homogenized with Ultra-Turrax (T18 basic, IKA® Works, Inc., USA) and then incubated at 30°C, 160 rpm, for 24 h. One milliliter of this pre-inoculum was subsequently transferred to 50 mL of the fresh medium and incubated for an additional 96 h under the same conditions. The fermented medium was chilled to 4°C and filtrated for biomass removal, and the supernatant was fractionated by ammonium sulfate 80% saturation. Following centrifugation at $9.500 \times g$ (J2-21, Beckman Centrifuge, USA), the precipitate was dialyzed against distilled water at 4°C and freeze dried (Prazeres et al., 2006).

Production of biosurfactant (BS)

B. subtilis was inoculated into cassava wastewater as the culture medium. Fermentation was conducted in a pilot bioreactor (8000 MP80, New Brunswick Sci., Edison, NJ, USA) under the following conditions: temperature 35°C, shaking at 150 rpm and aeration of 15 L.h⁻¹. The biosurfactant was recovered by foam produced during the

fermentation process. The liquefied foam was centrifuged and the precipitate was treated with chloroform/methanol (65:15, v/v) and dried (Barros et al., 2008a).

Effects of surfactant and biliar salt on stability of lipase

Anionic surfactants (1×10^{-5} to $1 \times 10^{-3}\%$ [w/v] concentrations) such as sodium dodecyl sulphate (SDS), linear alkyl benzene sulphonate (LAS), sodium deoxycholate (BL) and biosurfactant from *B. subtilis* (BS) were incubated with 1 mg/mL^{-1} of alkaline lipase at 30°C for 1 h. Lipase activity (U) was assayed by titrimetry using 5 mL of olive oil emulsion (olive oil and 7% arabic gum solution [25:75; v/v] homogenized for 3 min), 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 1 mL of lipase/surfactant mixture. The procedure was performed in an orbital bath (C 76, New Brunswick Sci., NJ, USA) at 30°C , 160 rpm, for 30 min. The reaction was immediately halted by adding a 15 mL acetone:ethanol mixture (1:1; v/v), and the freed fatty acids were titrated against 50 mM NaOH. For the calculations, the same conditions were observed in order to generate a standard oleic acid versus 50 mM NaOH curve. A unit of lipase activity was defined as the activity required to release 1 μmol of fatty acid per min. In turn, activity was expressed as residual activity (RU%) in relation to the surfactant-free assay (Macedo et al., 1997; adapted).

Preparation of soiled fabric

Pieces of cotton fabric measuring 1.5 cm^2 were defatted in boiling water and hexane, weighed and soiled by spotting with 100 μL of an olive oil:benzene mixture (1:1; w/v) applied with a micropipette.

Washing solutions

The washing solutions were prepared as shown in Table 1. The freeze-dried lipase and the biosurfactant were dissolved in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer and distilled water, respectively. Both mixtures were kept in cold bath prior to the washing procedure. Control solutions containing only lipase or only biosurfactant were prepared in the same manner.

Table 1. Composition of washing solutions

Composition	Volume (mL)			
	AL ¹	BS ²	AL/BS mix ^{1,2}	Control
50 mM buffer ³	3	3	3	3
Lipase solution	1	---	1	---
Biosurfactant solution	---	1	1	---
Distilled water	1	1	---	2
Final volume (mL)	5	5	5	5

¹ AL: alkaline lipase from *F. oxysporum*, ² BS: biosurfactant from *B. subtilis*,

³ buffer: sodium phosphate buffer pH 8.0

Washing procedure

The weighed, soiled fabrics were immersed in washing solution in 25-mL Erlenmeyer flasks and put in an orbital bath (C76, New Brunswick Sci, NJ, USA) at 150 rpm. They were then clamped, hung and rinsed twice in 50 mL of distilled water. Lastly, they were air-dried at 105°C for 1 h. The procedure was performed at different temperatures and over different periods of time, as well as for various AL/BS concentrations.

Measurement of oil removal

The amount of olive oil removed was calculated using the following equation, which is based on the difference in the weight of the oil before and after washing.

$$\%removal = \frac{Wb - Wa}{Wb} \times 100$$

where: Wb is the weight of the oil impregnated in the cotton fabric before washing, and Wa is the weight of the oil impregnated in the fabric after washing.

Effect of AL and BS concentrations on oil removal

The AL was dissolved in 50 mM TRIS-HCl pH 8.0 and the BS in distilled water, both in proportions of 0 to 5 mg.mL⁻¹. Both solutions were refrigerated until used. The washing procedure was carried out as described above.

Effect of alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) on oil removal

Mixtures of 3 mg.mL⁻¹ of biosurfactant and different concentrations of alkaline lipase were prepared and refrigerated. The removal of oil from cotton fabrics was assayed as described in the section on the washing procedure.

Effect of lipase on oil removal by other detergents

Synthetic surfactants such as Tween 80, Triton X-100 and SDS (sodium dodecyl sulphate), commercial detergents such as Surf® (10 mg.mL⁻¹) and the biosurfactant from *B. subtilis* (3 mg.mL⁻¹) were assayed in the presence and absence of alkaline lipase (0.5 mg.mL⁻¹) to determine their capacity to remove oil from cotton fabrics. The assays were performed at 30°C, 160 rpm and pH 8.0.

Statistical analysis

The mean value and respective standard error for each repetition were calculated using Microsoft[®] Excel 2000 software. The Tukey test was performed utilizing the SAS[®] System for Windows (SAS Institute Inc. Release 8.02 TS Level 02M0) and assuming a *p*-value of 5%.

Results and Discussion

Effect of surfactants on enzyme stability

The stability of alkaline lipase was tested against that of synthetic anionic surfactants and of *B. subtilis* biosurfactant, as shown in Fig. 1.

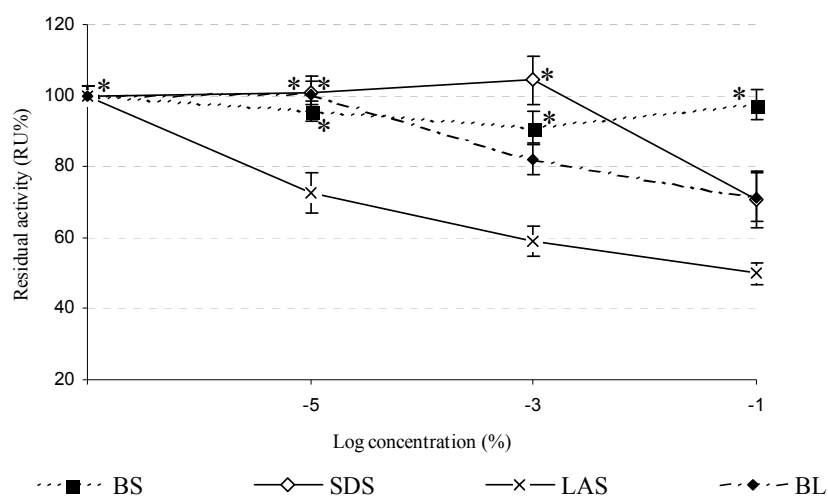


Fig. 1 Effect of different anionic surfactant concentrations on the stability of *F. oxysporum* alkaline lipase (1 mg/mL⁻¹). Enzymatic activity was assayed for 30 min. at 30°C, pH 8.0, after 1h of the incubation at 30°C with the following surfactants: biosurfactant from *B. subtilis* (BS), sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium linear alkyl benzene sulphonate (LAS) and sodium deoxycholate (BL) in concentrations ranging from 1×10^{-5} to 1×10^{-1} % (w/v). Two experiments were performed three times each. The bars represent the standard deviations, and the points with (*) showed no significant differences ($p < 0.05$) at Tukey test.

The enzyme was more stable in the presence of the *B. subtilis* biosurfactant (BS) than in that of the other anionic surfactants. Even in the presence of high concentrations of BS (0.1%), the residual activity of the lipase remained at approximately 97%. There were no significant differences between any of the BS concentrations and the control group ($p < 0.05$). This result agrees with the initial data reported in the literature, which indicate that the enzyme remains quite stable in the presence of the biosurfactant surfactin (Prazeres et al., 2006). In the case of SDS, the activity of the enzyme is slightly stimulated at concentrations below 0.001% (w/v), but significantly inhibited at higher concentrations ($p < 0.05$). Other authors have observed that anionic surfactants (SDS) destabilize the lipases from *Pseudomonas* sp. (Gao et al., 2000), *Ralstonia pickettii* (Hemachander & Puvanakrishnan 2000), *Burkholderia cepacia* RGP-10 (Rathi et al., 2001) and *F. oxysporum* (Prazeres et al., 2006). In contrast, enzymes such as those from *A. niger* (Kamini et al., 1998; Saisubramanian et al., 2006) and *P. aurantiogriseum* (Lima et al., 2004) remain stable in the presence of anionic synthetic surfactants. LAS is the surfactant that most affects the stability of the enzyme, for even in very low concentrations (10^{-5} % of surfactant), it reduces the activity of the lipase by about 30%. With respect to inhibiting activity, the effect of BL is similar to that of LAS, but less intense. In turn, bile salt reduces the enzyme activity of *Pseudomonas* sp. by approximately 50% in the presence of sodium deoxycholate (Gao et al. 2000), this result being similar to that presented in Fig. 1.

Effect of alkaline lipase on oil removal from cotton fabrics

Oil removal from cotton fabrics increased as the concentration of lipase increased, reaching values of approximately 47 and 52%, respectively, for enzyme concentrations of

0.5 and 1 mg.mL⁻¹. For higher concentrations, fat removal tended to become constant, attaining 60% at 5 mg.mL⁻¹ (Fig. 2).

The use of microbial enzymes in commercial detergents has been widely researched. When the lipase from *C. cylindracea* was tested in 1986, the authors found that adding the fungal enzyme to the system increased fat removal by 15 to 20% (Fujii et al., 1986).

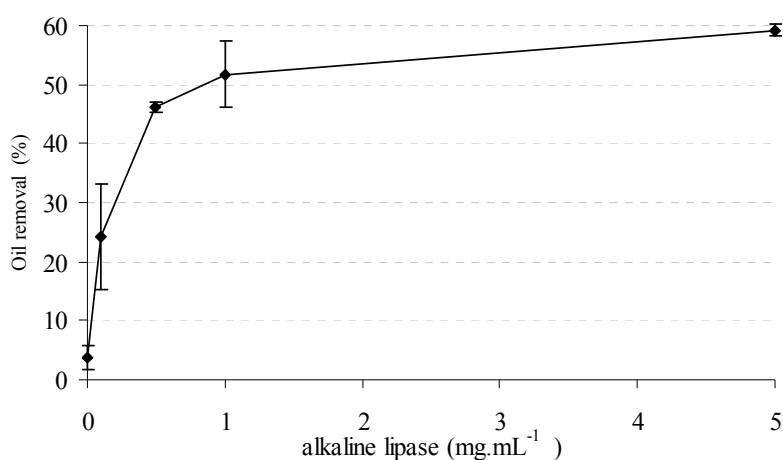


Fig. 2 Effect of alkaline lipase from *F. oxysporum* on oil removal from cotton fabrics. The assay was carried out at 30°C, 150 rpm, for 30 min. The oil removal values were obtained by weighing fabrics before and after treatment. Two experiments were performed three times each, and the bars represent the standard deviations.

It was later reported that including lipase from *Penicillium cyclopium* var. *album* in detergent formulations improved the removal of fat from fabrics by about 20% (Xia et al. 1996). The lipase from *Ralstonia pickettii* as a laundry detergent additive has also been evaluated. At a concentration of 150U, the enzyme produced a 28% increase in the removal of fat from cotton fabrics treated at 37°C, pH 7.0, for 30 minutes (Hemachander & Puvanakrisnan 2000). Recently, the effectiveness of the lipase from *Aspergillus niger* was

tested. The authors found that detergent formulations containing the lipase were 10 to 22.5% more effective than lipase-free systems for removing fat from cotton fabrics (Saisubramanian et al., 2006).

Adding cutinase during the wash phase led to removal of 15 to 20% more fat, thus showing the enzyme to offer a slight but significant advantage. It can therefore be deduced that in the wash phase, the enzyme mainly contributes to removing fat by dissolving hydrolysis products in the water phase (Flipsen et al., 1998).

Effect of biosurfactant on oil removal

In the case of the biosurfactant, gradually more oil was removed from the fabrics as the concentration of *BS* was increased, peaking at 51% for 3 mg.mL⁻¹ of *BS*. However, at concentrations of over 3 mg.mL⁻¹, the rate of removal slightly decreased and then became constant (Fig. 3). The biosurfactant from *B. subtilis* has recently been proven to be an effective agent for the removal of fat from cotton fabrics (Mukherjee, 2007).

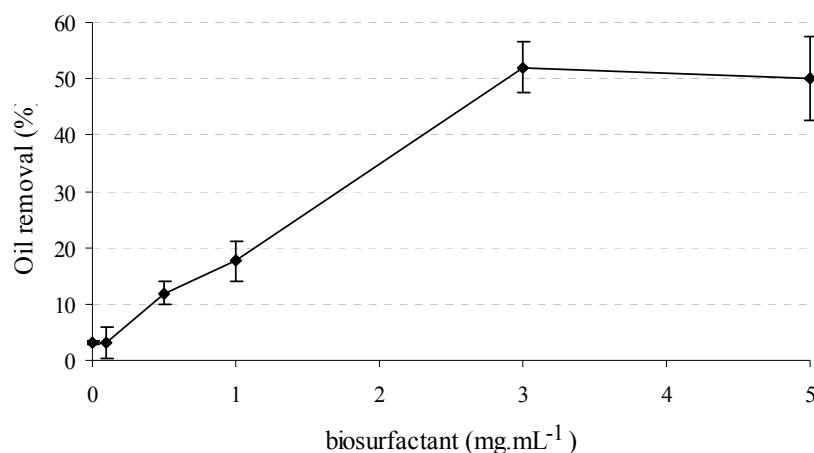


Fig. 3 Effect of biosurfactant from *B. subtilis* on oil removal from cotton fabrics. The assays were carried out at 30°C, 150 rpm, for 30 min. The oil removal values were obtained by weighing fabrics before and after treatment. Two experiments were performed three times each, and the bars represent the standard deviations.

Effect of AL/BS mix on oil removal

The synergistic effect of the biosurfactant on the lipase system was observed for all the concentrations tested. Whereas lipase concentrations of 0.5, 1 and 5 mg.mL⁻¹ increased oil removal by 8.2, 8.7 and 5.4%, respectively (Fig. 4), lower concentrations of lipase (e.g., 0.1 mg.mL⁻¹) combined with 3 mg.mL⁻¹ of surfactant raised the value to 52.9%, or a 32.5% increase in the effectiveness of the detergent solution. These results show that smaller amounts of lipase can be used in conjunction with biosurfactants to generate more efficient, lower-cost products for cleaning cotton fabrics. Prior to this study, various authors had already reported that combining lipases and synthetic surfactants improved the effectiveness of detergents from the standpoint of oil removal.

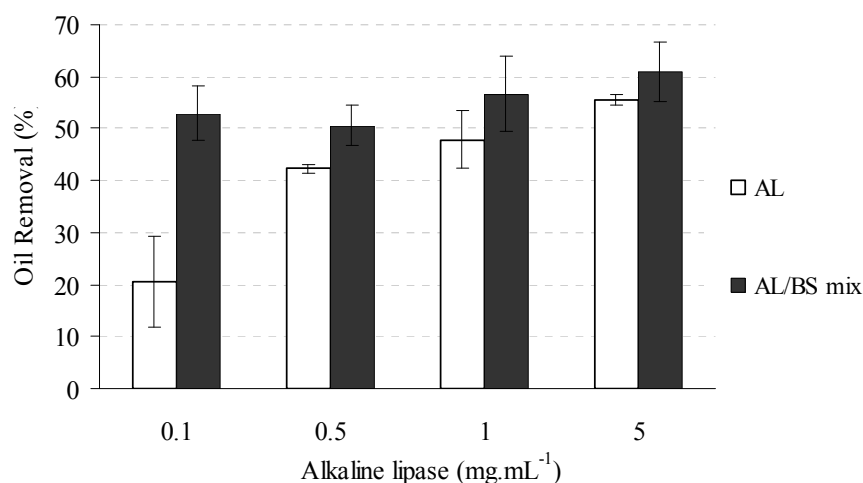


Fig. 4 Effect of alkaline lipase from *F. oxysporum* and biosurfactant from *B. subtilis* mixture (AL/BS mix) on oil removal from cotton fabrics. The assay was carried out at 30°C, 150 rpm, for 30 min. The oil removal values were obtained by weighing the fabrics before and after treatment. Two experiments were performed three times each, and the bars represent the standard deviations.

Among these, the following can be cited with reference to the lipase from *Candida cylindracea* (Fujii et al., 1986), *Ralstonia pickettii* (Hemachander & Puvanakrisnan, 2000), *Aspergillus niger* (Saisubramanian et al., 2006) and *Cryptococcus* sp. S-2 (Thirunavukarasu et al., 2008).

Effect of lipase on oil removal by other detergents

Various surfactants, commercial detergents and microbial surfactants with and without lipase from *F. oxysporum* were tested for their efficiency in removing olive oil from cotton fabrics. The percentage of oil removed from the fabrics was higher (3–15%) in the presence of lipase for all the detergents (Fig. 5).

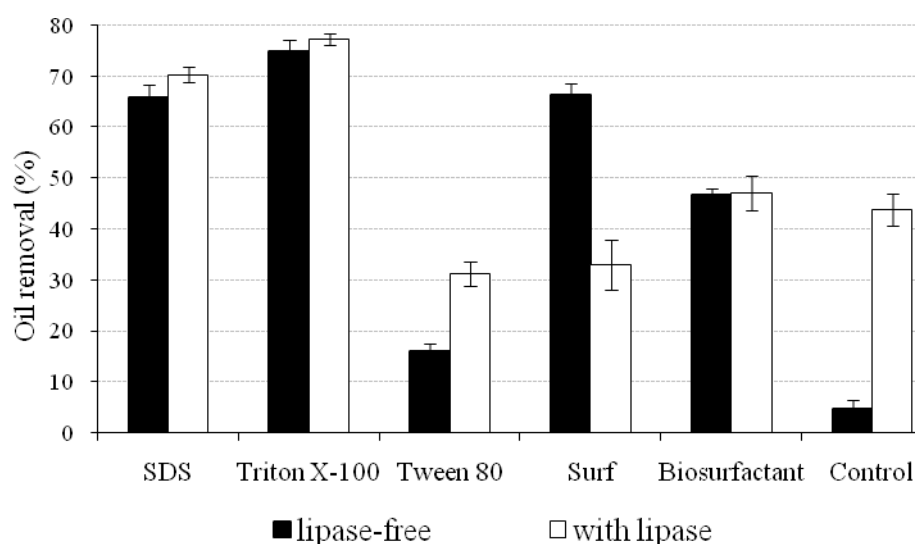


Fig. 5 Effect of absence and presence of *F. oxysporum* lipase (0.5 mg/mL^{-1}) on olive oil removal from cotton fabrics using different detergents (10 mg/mL^{-1}) and *B. subtilis* biosurfactant (3 mg/mL^{-1}). The assay was carried out at 30°C , 150 rpm, for 30 min. The oil removal values were obtained by weighing the fabrics before and after treatment. Two experiments were performed three times each, and the bars represent the standard deviations.

The overall performance of the *B. subtilis* biosurfactant was similar to that of the anionic surfactants SDS and LAS, though slightly less efficient. This may be attributable to the purification grade of the microbial surfactant.

With respect to fat stain removal, the higher efficiency of detergent formulations that contain both lipolytic enzymes and biosurfactants have been reported in earlier studies. For example, combining nonionic/anionic surfactants and lipase from *Candida cylindracea* increased efficiency by 15 to 20% (Fujii et al., 1986). In turn, lipase from *Penicillium cyclopium* improved detergency by approximately 20% (Xia et al., 1996), while lipase from *Ralstonia picketti* increased the oil removal capacity of commercial detergents by 24-27% (Hemachander & Puvanakrisnan 2000). In the present study, it has been shown that combining the lipase from *F. oxysporum* and the biosurfactant produced by *B. subtilis* can potentially enhance the detergency power of the surfactant. Although the preliminary results are encouraging, further research is required to gain a full understanding of the functional characteristics of the synergistic effect of combining the lipase and the biosurfactant.

Conclusion

The lipase from *F. oxysporum* and the biosurfactant from *B. subtilis* have potential applications in detergent formulations as additives for removing fat stains from cotton fabrics. Additional research should be performed to establish the best conditions for purifying and commercially producing lipase and biosurfactant from the two strains, as well as for determining their stability in dry and liquid commercial detergent formulations.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

References

- Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a cristalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Comm* 31: 488-494.
- Barros FFC, Ponezi AN, Pastore GM (2008a) Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1071-1078.
- Barros FFC, Quadros CP, Pastore GM (2008b) Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfatante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência Tecnol Alim* 28: 979-985.
- Cserhádi T, Forgács E, Oros G (2002) Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ Int* 28: 337-348.
- Flipsen JAC, Appel ACM, Van der Hijden HTWM, Verrips CT (1998) Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. *Enz Microb Technol* 23: 274-280.
- Fujii T, Tatara T, Minagawa M (1986) Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency: I. Effects of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. *J Am Oil Chem Soc* 63: 796-799.

- Gao X, Cao S, Zhang K (2000) Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb Technol* 27: 74-82.
- Gerritse G, Hommes RWJ, Quax WJ (1998) Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Appl Environ Microbiol* 64: 2644-2451.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39: 235-251.
- Hemachander C, Puvanakrisnan R (2000) Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochem* 35: 809-814.
- Holmberg K (2001) Natural surfactants. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 6: 148-159.
- Ito S, Kobayashi T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Hatada Y (1998) Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *Extremophiles* 2: 185-190.
- Kamini NR, Mala JGS, Puvanakrishnan R (1998) Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochem* 33(5): 505-511.
- Lang S (2002) Biological amphiphiles (microbial surfactants). *Curr Opin Coll Interf Sci* 7: 12-20.
- Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Fontana JD (2004) Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem Eng J* 18: 65-71.
- Macedo GA, Park YK, Pastore GM (1997) Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Rev Microbiol* 28: 90-95.

- Maier RM (2003) Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 52: 101-121.
- Makkar RS, Cameotra SS (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 428-434.
- Minogushi M, Muneyuki T (1989) Immobilization of lipase on polyacrylamide and its use in detergents. *Jpn. Patent* 1.285.188.
- Mukherjee AK (2007) Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett Appl Microbiol* 45: 330-335.
- Mulligan C (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133: 183-198.
- Nishioka M, Joko K, Takama M (1990) Lipase manufacture with *Candida* for use in detergents. *Jpn. Patent* 292.281.
- Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz J Microbiol* 35: 81-85.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 553-563.
- Prazeres JN, Cruz JAB, Pastore GM (2006) Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian J Microbiol* 37: 505-509.
- Rathi P, Saxena RK, Gupta R (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry* 37: 187-192.

Saisubramanian N, Edwinolier NG, Nandakumar N, Kamini NR, Puvanakrishnan R (2006)

Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. J Ind Microbiol Biotechnol 33: 669-676.

Tatara T, Fujii T, Kawase T, Minagawa, M (1985) Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency: II. Evaluation of adaptability of various kinds of lipases in practical laundry conditions. J Am Oil Chem Soc 62: 1053-1058.

Thirunavukarasu K, Edwinoliver NG, Anbarasan SD, Gowthaman MK, Iefuji H, Kamini NR (2008) Removal of triglyceride soil from fabrics by a novel lipase from *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochem 43: 701-706.

Xia J, Chen X, Nnanna IA (1996) Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. J Am Oil Chem Soc 73: 115-120.

Capítulo 4

**Remoção de diferentes triglicerídeos de superfície rígida por
uma mistura de lipase alcalina e biossurfatante.**

**Remoção de diferentes triglicerídeos de superfície rígida por uma mistura de lipase
alcalina e biossurfatante.**

Cedenir P. de Quadros* e Glaucia M. Pastore

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
UNICAMP, Rua Monteiro Lobato 80, CEP: 13083-862, Campinas – SP, Brasil.

* A quem a correspondência deve ser enviada

e-mail: cdquadros@yahoo.com.br

Tel.: 55 19 3521 4090; Fax: 55 19 3521 3887

Artigo submetido para a *Revista Química Nova*.

Campinas, 2009

Resumo

Uma inédita mistura composta da combinação de lipase alcalina produzida por *Fusarium oxysporum* e de biossurfatante de *Bacillus subtilis* (LA/BS) foi proposta como componentes em sistemas detergentes. Para testes *in vitro*, superfícies rígidas de aço inoxidável foram recobertas com diferentes tipos de gorduras, como por exemplo, gordura suína, gordura de frango, manteiga e creme de leite como forma de simular situações vistas em frigoríficos e laticínios. As condições usadas no sistema de lavagem foram 30°C, pH 7,0, 150 rpm por 30 min. A presença do BS e da mistura LA/BS, de uma forma geral, melhorou a remoção das gorduras presentes nas placas conforme aumentou a concentração dos compostos. A manteiga foi a gordura que menos foi influenciada pelos detergentes. Como padrão de detergência foi utilizado o surfatante SDS na concentração de 1,5%. Este teste mostrou eficiência, sensibilidade e pode ser aplicado para desenvolver testes de novas formulações. Além disso, os resultados são encorajadores para o aprofundamento das pesquisas, visando uma real aplicação dos produtos biotecnologicamente produzidos.

Palavras-chaves: lipase de *F. oxysporum*, biossurfatante de *B. subtilis*, aço inoxidável, remoção de gordura

Removal of Different Triglycerides from Rigid Surfaces by a Mixture of Biosurfactant and Alkaline Lipase

Abstract

A unique mixture from the combination of alkaline lipase produced by *Fusarium oxysporum* and biosurfactant of *Bacillus subtilis* (LA/BS) was proposed as components in system detergents. For *in vitro* tests, rigid stainless steel surfaces were coated with different kinds of fat, such as, pork fat, chicken fat, butter and cream as a way to simulate situations found in cooling rooms and in dairy. The water conditions used in the wash were 30°C, pH 7.0, and a 150 rpm for 30 min. The presence of BS and of the mixture of LA/BS, in general, improved the removal of fats present in the plaques as the compound concentration increased. Butter is a fat that was less affected by the detergents. As a standard detergent, surfactant SDS was used at a concentration of 1.5%. This test showed efficiency, sensitivity and may be applied to develop tests for new formulations. Furthermore, the results are encouraging for the development of research aiming at the real application of biotechnology products being produced.

Keywords: lipase from *F. oxysporum*; biosurfactant form *B. subtilis*, stainless steel, oil removal

1. Introdução

O campo de aplicação mais importante comercialmente para lipases hidrolíticas é sua adição em detergentes, os quais são usados principalmente em lavanderias domésticas e industriais, assim como em lava-louça domésticas. O poder de limpeza dos detergentes parece já ter atingido o auge; todos os detergentes são muito similares e são baseados nos mesmos mecanismos de ação. Para melhorar o poder de detergência, modernos sabões em pó e detergentes para equipamentos automáticos contêm uma ou mais enzimas como proteases, amilases, celulasas e lipases (Ito et al., 1998).

Limpeza é a remoção de sujeira fixada ou encrostada sobre uma superfície. O objetivo é retornar a aparência dessa superfície como ela era antes de estar “suja”. As bases físico-químicas da detergência por surfatantes em soluções aquosas foram descritas primeiramente por Lawrence em 1960 (Lawrence, 1961), porém isto apenas ganhou interesse prático na década de 90. Nesse tempo, as temperaturas de limpeza se tornaram menores na Europa devido à preocupação com a economia de energia em lavanderias e o surgimento de novos surfatantes não iônicos, permitindo assim, uma melhora na otimização dos mecanismos de limpeza (Krüssmann e Bercovici, 1993; Chateau et al., 2004).

A limpeza é um processo multiestágio constituído de vários passos que devem ser controlados pelos mecanismos de ação, reações químicas e transferência de massa. O processo pode ser baseado em três quesitos: excelência, uniformidade e desgaste (Gillham et al., 1998). Estudos anteriores mostraram que a dissolução das sujidades na solução de limpeza é um importante fator de controle no processo de limpeza, principalmente no quesito uniformidade (Bird e Fryer, 1991; Gillham et al., 1999; Xin et al., 2002, Xin et al., 2004).

As aplicações industriais das enzimas começaram vagarosamente nos meados de 1930, baseado na patente de Röhm (1913), que relatou o uso de enzimas pancreáticas em soluções pré-molho. Atualmente, as enzimas são utilizadas como ingredientes funcionais que contribuem para limpeza em um processo eficiente, com menor impacto ambiental e energeticamente econômico.

O uso de solventes orgânicos para desgordurar metais tem sido substituído devido às preocupações ambientais, de segurança e de saúde desde a década de 90 (Morris e Arthur, 1995). O circuito integrado das indústrias, com peças cada vez menores e aumento de sua capacidade, fez com que as partículas de sujeiras se tornassem uma importante fonte de defeitos. Em outras áreas, assim como a indústria de alimentos, a legislação torna-se rigorosa, e significou um decréscimo na eficiência das operações e qualidade dos produtos (Karlsson et al. 1998). Por estas razões, limpeza aquosa tem sido explorada mais e mais durante a última década. O mecanismo de remoção de sujeiras gordurosas por surfatantes aquosos tem sido descrito em três passos sucessivos (Gomez Herrera, 1996): *i*) transporte do surfatante dentro da fase aquosa sobre o substrato e a superfície suja; *ii*) penetração da molécula de surfatante na sujeira, levando a uma dissolução da sujeira e diminuição da energia de adesão pra sujeiras sólidas; *iii*) transporte e dispersão da sujeira deslocada no sistema de lavagem.

Além disso, o uso de líquidos também facilita a remoção de partículas. Líquidos possuem menores forças de atração de Van der Waals e a força exercida pela sua tensão superficial é oposta às forças de adesão entre a partícula e o substrato (Chateau et al., 2004).

Não há métodos padrões disponíveis para avaliar a eficiência da limpeza de superfícies rígidas, mas muitos testes foram desenvolvidos com substratos e sujeiras bem

definidos. Em 1996, foi descrito uma cabine de pressão controlada de *spray* limpante, como também vários testes de imersão são relatados na literatura. A eficiência na limpeza tem sido avaliada usando numerosos métodos analíticos (Chateau et al. 2004).

Em geral, a limpeza de superfícies rígidas, por exemplo, limpeza de chão, é feita usando produtos que normalmente consistem em uma mistura de compostos ativos dissolvidos em água. Sendo os mais importantes os surfatantes, componentes alcalinizantes e os solventes orgânicos. Os surfatantes podem ser divididos em quatro categorias dependendo do caráter dos grupos hidrofílicos: aniônicos, catiônicos, não iônicos e *zwiteriônicos*. Os mais importantes são os aniônicos, seguidos pelos não iônicos (Bäckström e Engström, 1988).

Com propósito de investigar “*in vitro*” o comportamento das enzimas frente às condições nas indústrias de alimentos, Chateau et al. (2004) relataram um novo teste para avaliar a eficiência da limpeza de superfícies rígidas sem ação mecânica. Os autores utilizaram uma mistura de gorduras aderida a uma placa de aço inoxidável e uma solução detergente com surfatantes sintéticos. Os parâmetros escolhidos foram temperatura, concentração das soluções detergentes e agitação. O teste foi fácil de executar, tem alta sensibilidade, e pode ser adaptado para resolver problemas encontrados pelos formuladores de detergentes.

Alguns outros trabalhos avaliaram técnicas de limpeza de superfícies rígidas, como por exemplo, pela determinação da cinética de remoção de filmes de gel de concentrado de proteína de soro de leite das superfícies de tubos de aço inoxidável pelo método de espectrofotometria (Xin et al. 2004). Neste estudo, foram avaliados a influência da temperatura, fluxo de velocidade e quantidade de sujeira sobre o comportamento da limpeza.

Cox (1986) estudou a imersão de placas de alumínio recobertas com diferentes tipos de sujidades em sistemas contendo detergentes e examinou o efeito das estruturas destes surfatantes sobre a eficiência de remoção. Em 1988, Bäckström e Engström estudaram a remoção de gordura de policloreto de vinila (PVC) por surfatantes sintéticos. Fatores como CMC do surfatante, o comprimento da cadeia do surfatante, o pH, a temperatura e a agitação foram analisados. Eles concluíram que o processo de limpeza envolve muitos passos consecutivos ao nível molecular e as medidas fornecem informações interessantes sobre o mecanismo de limpeza.

Diversos outros estudos com o intuito de avaliar a remoção de resíduos de superfícies rígidas têm sido publicados, como, por exemplo, o uso da elipsometria para determinar a remoção de triglicerídeos de PVC e superfícies cromadas (Engström e Bäckström, 1987), remoção de ácido araquídico pela técnica “quartz crystal microbalance (QCM)” com superfícies de polietileno, nylon 6 e acetato de celulose (Gotoh, 2005), medição do ângulo de contato da gordura com a superfície de aço inoxidável (Davis et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de remoção de diferentes tipos de gorduras presentes em indústrias de alimentos de superfície rígida de aço inoxidável, utilizando uma inédita combinação de lipase alcalina produzido por *Fusarium oxysporum* e biossurfatante de *Bacillus subtilis*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.2.1 Gorduras

Manteiga, nata de leite, gordura suína e gordura de frango adquiridas em supermercados locais.

2.1.2 Superfície rígida

Foram utilizadas placas de aço inoxidável AISI 304 cortadas com 1,5 cm² e com um orifício próximo a uma das quinas. Depois de lavadas com água destilada, as placas foram mergulhadas cinco vezes em éter, secadas em papel toalhas e pesadas em balança analítica (f_0). As placas limpas, suspensas por um gancho através do orifício foram mergulhadas na gordura a uma temperatura de 60°C e mantidas a temperaturas ambiente, em torno de 25°C, para secagem. Depois de secas, as placas foram pesadas novamente (f_1) e a quantidade de gordura aderida à superfície rígida foi quantificada.

2.2 Produção da lipase alcalina (LA)

O fungo *Fusarium oxysporum* foi previamente isolado de frutas e solo do nordeste brasileiro. O micro-organismo foi cultivado a 30°C por 96 horas em meio sólido Yeast Malt (YM): 0,5% de peptona, 1% glicose, 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura e 2% de Agar (% p/v). Após isto, foi transferido um bloco de 1cm² para 20 mL de meio sintético (MS): 1% de azeite de oliva, 1,5% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de K₂HPO₄ e 0,04% de MgSO₄.7H₂O (% p/v), pH 6,0, homogeneizado com ultra-turrax (T18 basic, IKA Works, Inc., Wilmington, EUA) por 1 minuto e deixado em banho-maria

rotatório por 24 horas, 30°C e 160 rpm (C 76, New Brunswick Sci., Edison, NJ, USA). Um mililitro deste pré-inóculo foi transferido para 50 ml de MS e incubado nas mesmas condições por 96 horas. Após incubação, o meio foi filtrado, o sobrenadante foi resfriado a 5°C, adicionado de sulfato de amônio até uma saturação de 80%, mantido em repouso por 12 h, centrifugado a $9.500 \times g$ (J2-21, Beckman, USA) a 5°C por 15 minutos. O precipitado foi dialisado em membrana de celulose (Membra-Cell MD 44-14, Viskase Companies, Inc., IL, USA) contra água destilada e liofilizado, sendo denominado extrato bruto seco (Prazeres et al., 2006).

2.3 Produção do biossurfatante (BS)

A cepa de *Bacillus subtilis* previamente isolada (Nitschke et al., 2004) foi utilizada para produzir o biossurfatante como descrito por Barros et al. (2008). O substrato utilizado foi a manipueira em um fermentador com capacidade para 80 litros (Mobile Pilot Plant Fermentor MP 80, New Brunswick, Edison, NJ, EUA) nas condições de 35°C, agitação de 150 rpm e aeração média de 20 litros de ar/hora. A recuperação primária do biossurfatante foi feita pela coleta da espuma produzida no interior do fermentador. Após o colapso da espuma, a biomassa foi removida por centrifugação a $9.500 \times g$, 5°C por 20 minutos, o sobrenadante foi acidificado até pH 2,0 e novamente centrifugado. O precipitado foi ressuspenso em água, neutralizado até pH 7,0 e seco. Após isto, o produto foi extraído com clorofórmio/metanol (65:15) e seco. O produto final foi denominado biossurfatante semipurificado.

2.4 Preparo da mistura de lipase e biossurfatante (LA/BS)

O extrato enzimático liofilizado foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e o biossurfatante foi dissolvido em água destilada. Em seguida, a mistura foi feita e mantida sob refrigeração a 5°C até o momento das análises.

2.5 Formulação da solução detergente

Frascos com 50 ml de solução detergente foram colocadas em *shaker* orbital a 150 rpm, 30°C por 10 minutos para equilibrar a temperatura. A cada minuto, placas engorduradas foram mergulhadas na solução detergente por 30 min. Após este tempo, elas foram retiradas, rinsadas com 5 ml de água destilada e deixadas em estufa de secagem a 50°C para evaporar todo o excesso de água e pesadas (f_2).

2.6 Determinação da eficiência de limpeza

A quantidade de gordura removida pela solução detergente pode ser determinada pela diferença de peso das placas.

$$\%removal = \frac{f_1 - f_2}{f_1 - f_0} * 100 \quad (a)$$

Onde: f_0 é a peso da placa antes da gordura, f_1 é o peso da placa depois da gordura e f_2 é o peso da placa depois da lavagem.

2.7 Composição do sistema de limpeza

Foram usados detergentes padrões comerciais como dodecil sulfato de sódio (SDS) e detergente de laboratório DetLimp[®] adquiridos no comércio local, lipase alcalina de *F.*

oxysporum e biossurfactante de *B. subtilis* produzidos e preparados conforme descrito anteriormente. A composição de cada sistema de limpeza está ilustrada na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição da solução lavagem

	Soluções de lavagens (mL)				
	Controle	SDS	DetLimp	LA	LA/BS
Detergente	---	2	5	2	2
Biossurfactante	---	---	---	---	1
Tampão pH 7,0	---	2	---	2	2
Água destilada	5	1	---	1	---
Total	5	5	---	5	5

Tampão fosfato de sódio 0,05mol.L⁻¹; Concentrações: SDS e DetLimp®: 1,5%. LA (lipase alcalina de *F. oxysporum*); LA/BS (mistura de lipase alcalina e biossurfatante de *B. subtilis*).

Durante o tratamento de limpeza das placas as condições utilizadas foram: 30°C, 150 rpm por 30 minutos. Após o tratamento, as placas foram rinsadas com 5 ml de água destilada e colocadas em estufa a 50°C por 1 hora.

3. Resultados e discussão

Neste trabalho, as condições escolhidas para simular um tratamento detergente foram aquelas que mais se aproximavam da realidade industrial, não levando em conta, portanto, as condições ótimas da enzima anteriormente determinadas. Porém, foi trabalhado em condições onde a enzima ainda apresenta atividade residual e nunca nas faixas onde ela se apresenta totalmente inativa (Prazeres et al., 2006).

Como suporte para o estudo de remoção de gordura, foi escolhido o aço inoxidável como superfície rígida, já que é um material usado extensivamente neste tipo de indústria, tanto em mesas, bancadas, equipamentos como em utensílios em geral. Além disso,

diferentes fontes de lipídios foram usadas para exemplificar diversos tipos de indústria de alimentos, como por exemplo, frigoríficos e usina de beneficiamento de leites.

Na **Tabela 2** está apresentada a composição das diferentes gorduras utilizadas neste trabalho.

Tabela 2: Composição dos ácidos graxos das gorduras (%)				
Ácidos Graxos		Gordura de frango ^a	Gordura de porco ^{a,b}	Leite de vaca ^b
Butírico	4:0	---	< de 0,1	4,5
Capróico	6:0	---	< de 0,1	2,0
Caprílico	8:0	---	< de 0,1	1,3
Cáprico	10:0	---	< de 0,1	3,1
Laurico	12:0	---	< de 0,1	3,0
Palmítico	16:0	26,4	23,5	---
Esteárico	18:0	5,5	10,8	---
Oléico	18:1	37,5	47,1	25,0
Linoléico	18:2	21,2	14,3	2,3
Linolênico	18:3	1,2	0,6	1,0

^a Chiu e Gioielli (2002); ^b Bobbio e Bobbio (2001)

O uso de superfícies rígidas como o PVC, vidro, polímeros, aço inoxidável, etc., recobertos com algum tipo de sujidade e imersas em sistemas detergentes, é uma técnica que vem sendo utilizada já algum tempo. Porém não é uma técnica padronizada e cada pesquisador se utiliza de algumas particularidades. Seja ela no modo de aderir a gordura na superfície rígida, o modo de como submerger a placa no sistema limpante, como na forma de quantificar o resultado. Também existe uma ampla faixa das condições experimentais na qual pode se estudar, como uma faixa de temperatura (10 à 60°C), uma ampla faixa de pH (6 à 12), concentrações de sais, dureza da água, etc.

Nesse estudo, a temperatura foi fixada em 30°C, embora não seja a temperatura ótima da enzima, para avaliar o poder detergente da lipase de *F. oxysporum* sem nenhum fornecimento de energia térmica, imaginando ser possível a utilização desta enzima por parte dos setores industriais, mesmo em temperatura ambiente. O pH dos sistemas de lavagem foi ajustado para neutro, visando não inserir agentes alcalinizantes que muitas vezes podem ser agressores ao meio ambiente.

Em estudos prévios, foi preciso adequar as condições do sistema para que fosse possível reproduzir resultados reprodutíveis. Baseado em publicações, foi ajustado às nossas condições de laboratório e de material, por exemplo, o volume da solução detergente, tamanho das placas de aço inoxidável, tempo necessário de secagem em estufa (até obter peso constante), assim como a quantidade de gordura aplicada às superfícies. No caso deste estudo, foi observado que cerca de $20 \text{ mg} \pm 0,03$ era uma quantidade que cobria toda a superfície com uma fina camada homogênea (dados não mostrados), permitindo a maior superfície de contato possível com a solução limpante.

3.1 Remoção de gordura de superfície rígida

Na **Figura 1** é possível observar que à medida que foi aumentando a concentração de biossurfatante, aumentou-se a taxa de remoção da gordura suína, chegando a atingir uma melhora de 20,1% na concentração de 0,01 mg/mL de BS, porém a partir de 0,1 mg/mL a remoção atinge cerca de 25% e tende a se tornar constante. Quando a mistura de LA/BS (concentração de LA fixa em 0,5 mg/mL) foi testada, houve uma melhora no aumento da remoção, em relação ao BS, atingindo em torno de 30% na concentração de 1 mg/mL. Além disso, observa-se que entre as concentrações de 0,01 e 1% de BS, com a adição de 0,5mg/mL, a remoção de gordura foi superior ao sistema composto apenas por BS. A lipase

alcalina, portanto, teve um efeito sinérgico junto ao biossurfatante, significando em uma melhora da remoção de gordura das placas de aço inoxidável.

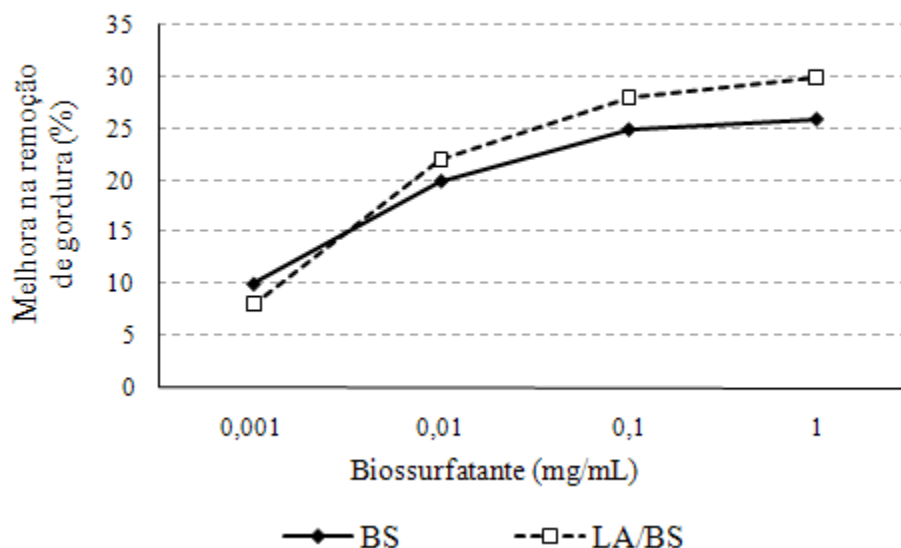


Figura 1: Porcentagem de aumento da remoção de gordura suína de superfície de aço inoxidável AISI 304. BS: biossurfatante de *B. subtilis*; LA/BS: mistura de 0,5 mg/mL de lipase alcalina de *F. oxysporum* e biossurfatante. As condições de análise foram 30 °C, 150 rpm por 30 min. Os pontos representam a média de duas repetições feitas em triplicata.

Quando se utiliza a manteiga (**Fig. 2**) como sujidade nas placas de aço inoxidável, o comportamento foi diferente. Independente da quantidade de biossurfatante adicionada ao sistema, o perfil de remoção não se alterou, assim como quando a mistura de enzima e biossurfatante foi utilizada. A taxa de remoção de gordura melhorou somente na faixa de 8 a 10% em relação ao sistema ausente de tensoativos. Neste caso, o grupo controle composto apenas de água removeu 3,3% de manteiga das placas.

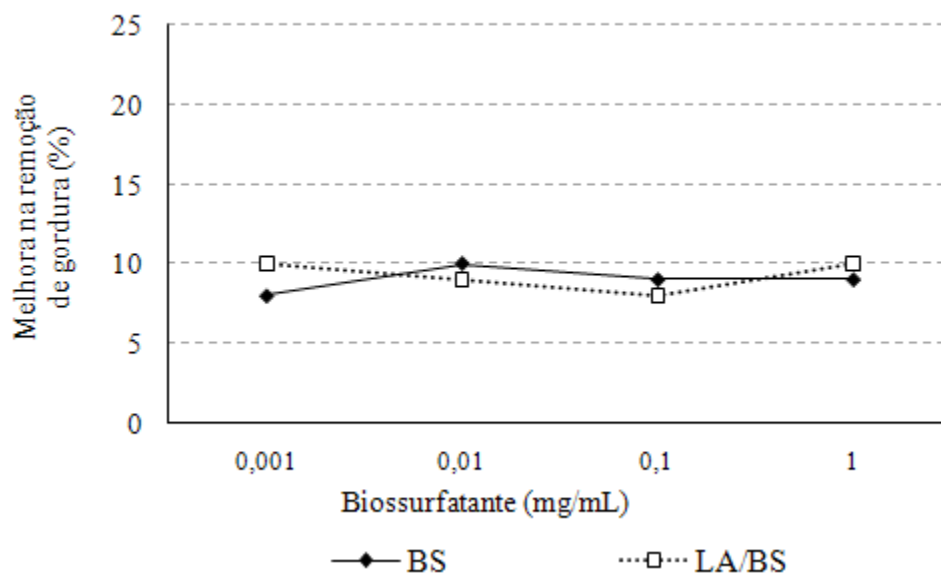


Figura 2: Porcentagem de aumento da remoção de manteiga de superfície de aço inoxidável AISI 304. BS: biossurfatante de *B. subtilis*; LA/BS: mistura de 0,5 mg/mL de lipase alcalina de *F. oxysporum* e biossurfatante. As condições de análise foram 30°C, 150 rpm por 30 min. Os pontos representam a média de duas repetições feitas em triplicata.

O aumento de remoção de gordura de frango da superfície de placa de aço inoxidável é representado na **Figura 3**. A presença de biossurfatante fez com que a remoção da gordura para a solução de lavagem fosse maior conforme se aumentou a sua concentração, chegando a uma melhora de 34,1% na concentração de 1,0 mg/mL. Com a mistura LA/BS, o perfil de remoção foi semelhante e, além disso, a adição de 0,5 mg/mL de lipase alcalina tornou o sistema mais eficaz (35,1% com 0,1mg/mL de BS na mistura), entretanto a partir desta concentração, a melhora na remoção não apresentou alteração. Nesse caso, o grupo controle composto de apenas água destilada removeu 5,1% da gordura.

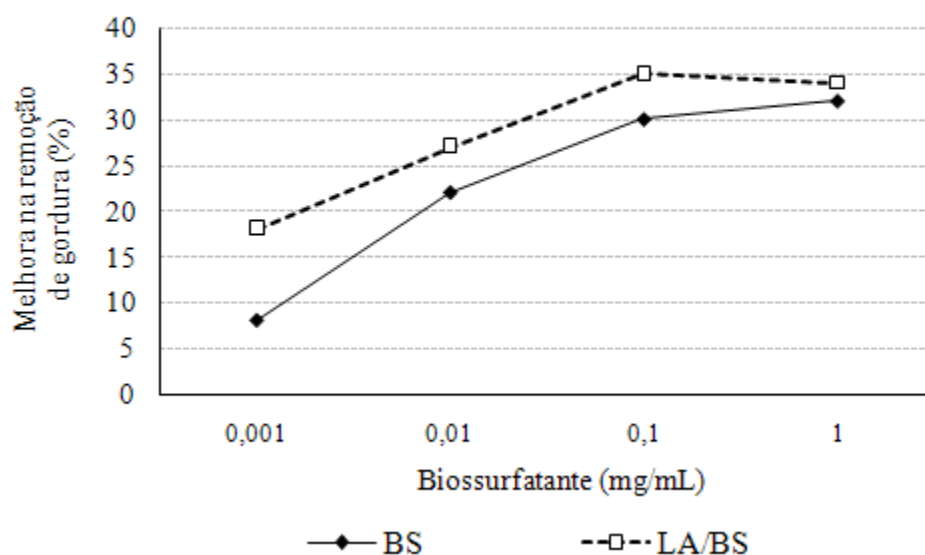


Figura 3: Porcentagem de aumento da remoção de gordura de frango de superfície de aço inoxidável AISI 304. BS: biossurfatante de *B. subtilis*; LA/BS: mistura de de 0,5 mg/mL de lipase alcalina de *F. oxysporum* e biossurfatante. As condições de análise foram 30°C, 150 rpm por 30 min. Os pontos representam a média de duas repetições feitas em triplicata.

O creme de leite, teve um perfil mais constante com a variação da concentração do biossurfatante (de 0,001 a 1 mg/mL), porém com valores mais altos, na faixa de 25 a 29% de melhoria na remoção. Assim como o perfil de remoção com a mistura LA/BS que se apresenta com pouca variação e, além disso, levemente menos eficaz do que com o BS apenas.

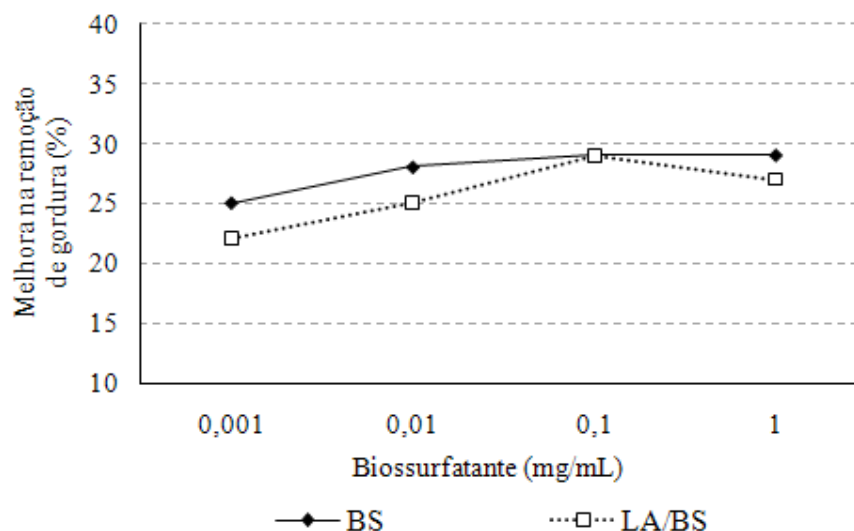


Figura 4: Porcentagem de aumento da remoção de creme de leite de superfície de aço inoxidável AISI 304. BS: biossurfatante de *B. subtilis*; LA/BS: mistura de 0,5 mg/mL de lipase alcalina de *F. oxysporum* e biossurfatante. As condições de análise foram 30°C, 150 rpm por 30 min. Os pontos representam a média de duas repetições feitas em triplicata.

Nas **Figuras 1 a 4** foi mostrado o grau de detergência dos diferentes tratamentos expressos em porcentagem (%) do aumento na remoção de gordura *versus* uma faixa de concentração dos detergentes em estudo em relação aos sistemas sem a presença de tratamentos. Podemos observar que de uma forma geral, a taxa de remoção de gordura aumenta conforme aumenta-se a quantidade de produto detergente. Além disso, a presença de lipase alcalina na mistura agregou uma eficácia ao tratamento de remoção em alguns casos, ou seja, de uma forma geral a presença dela fez com que aumentasse a melhora na remoção das gorduras das superfícies de aço inoxidável AISI 304. As gorduras que mais sofreram ação da lipase alcalina e do biossurfatante foram as gorduras de frango e suína. Segundo a **Tabela 2** os ácidos graxos majoritários dessas gorduras são o ácido palmítico (C 16:0) e o ácido oléico (C 18:1), demonstrando a especificidade da mistura LA/BS por esses

tipos de gorduras. Em estudo anterior, foi visto que a lipase de *F. oxysporum* foi ativa em uma grande variedade de substratos tanto de origem animal como vegetal. A trioleína foi o triglicerídeo que foi mais susceptível a ação da lipase fúngica, seguida da tricaprilina. A enzima mostrou maior atividade sobre os óleos vegetais do que a gordura animal. Dentre estas, a gordura de frango foi mais susceptível à hidrólise, equivalente ao substrato padrão azeite de oliva, do que a de creme de leite (Prazeres et al., 2006).

Na **Figura 5** pode ser feita a comparação entre a remoção de gordura das superfícies rígidas com os bioprodutos produzidos em laboratório com os surfatantes sintéticos encontrados no mercado. A remoção de gordura suína pelo BS e AL/BS foi muito semelhante à remoção produzida pelo SDS e o DetLimp®, indicando um bom desempenho dos bioprodutos.

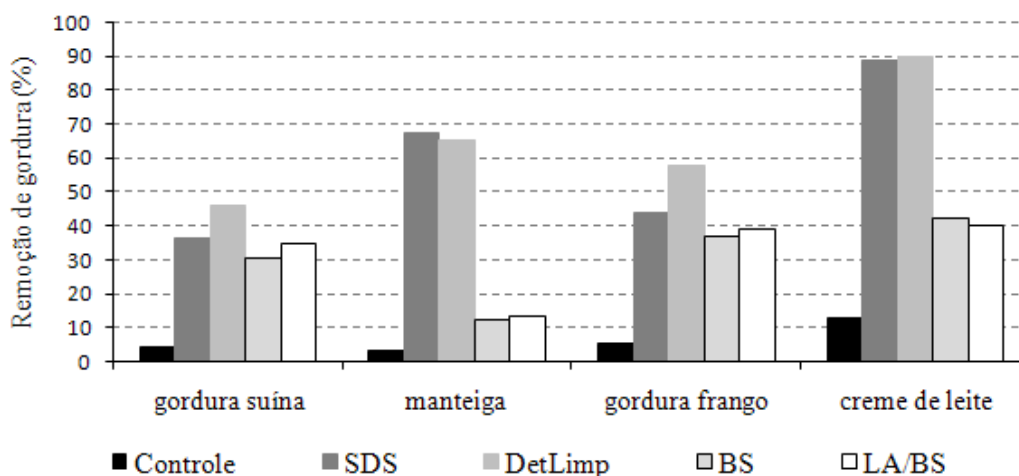


Figura 5: Efeito na remoção de diferentes tipos de gordura de superfície de aço inoxidável AISI 304. SDS e DetLimp®: 1,5% (m/v); BS: biossurfatante de *B. subtilis*; LA/BS: mistura de 0,5 mg/mL de lipase alcalina de *F. oxysporum* e biossurfatante. As condições de análise foram 30 °C, 150 rpm por 30 min. Os pontos representam a média de duas repetições feitas em triplicata.

Comportamento semelhante a este, foram os produzidos quando se utilizou gordura de frango como sujidade nas placas de aço inoxidável. A diferença entre o desempenho da

mistura de AL/BS e 1,5% de SDS foi de apenas 5%, mostrando novamente um bom desempenho para esse tipo de gordura. Em relação a manteiga e ao creme de leite, as diferenças entre as remoções foram mais acentuadas, porém não desprezíveis.

Segundo Cox (1986), a remoção de “sujeidades” é um processo com dois passos. Liquefação é o passo chave do mecanismo, pois envolve a penetração do surfatante (e outras moléculas associadas) dentro da “sujeidade”. Este processo prepara a sujeidade para outros processos que as removem das superfícies. Este processo secundário inclui a emulsificação, a redução da adesão entre a sujeidade e o substrato pela umidificação da superfície do substrato, simples agitação ou mecanismos abrasivos.

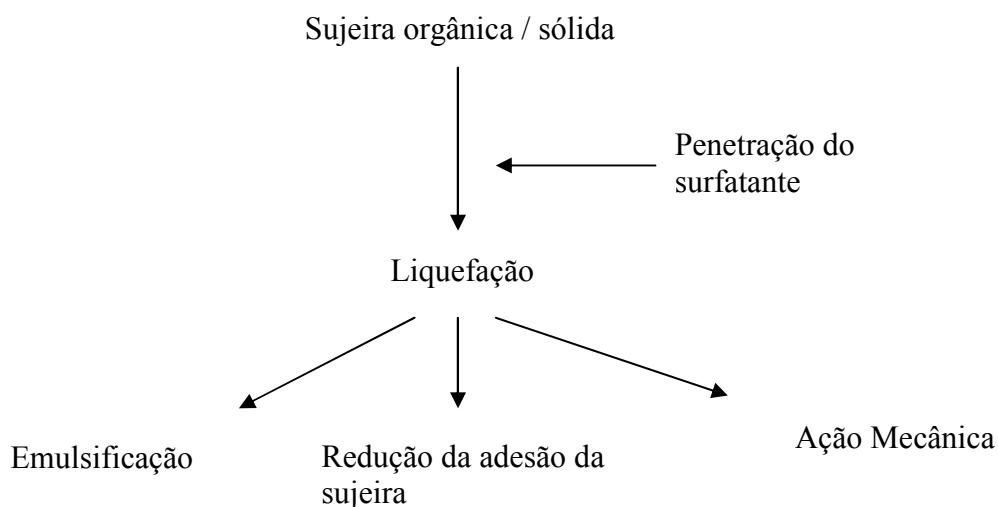


Figura 6: Modelo proposto correlacionando a penetração do surfatante (liquefação) com o processo de remoção da sujeira (Cox, 1986).

Este mecanismo, descrito acima, sugere diversas regras básicas para o desenvolvimento de soluções detergentes para remover sujeiras orgânicas e/ou sólidas de superfícies rígidas; i) no caso de aplicações envolvendo algum grau de ação mecânica, deve-se usar um surfatante com penetração maximizada (amaciamento), que pode ser

acompanhado pelo tamanho da cadeia hidrofóbica e solubilidade; ii) em aplicações envolvendo remoção estática, a habilidade do surfatante para emulsionar a sujeira deve ser maximizada; iii) em algumas aplicações, pode ser benéfico o uso de misturas de surfatantes os quais maximizam o poder de penetração e a emulsificação.

Melhores resultados de remoção da gordura poderiam ser alcançados se o grau de purificação tanto da enzima como do biossurfatante fossem maiores. Foi optado por graus de purificação bastante baixos devido à pequena quantidade de produto obtido quando submetido à mais passos de purificação. Neste tipo de ensaio que foi executado, foram necessárias quantidades consideráveis dos produtos. Apesar disso, resultados promissores foram alcançados quando foi utilizado os produtos brutos ou semi-purificados, estimulando assim o aumento na escala de produção, purificação dos produtos e aprofundamento das técnicas de avaliação como detergentes.

4. Conclusões

Produtos obtidos por via biotecnológica como a lipase alcalina produzida por *Fusarium oxysporum* e um biossurfatante produzido por *Bacillus subtilis* foram propostos como uma nova alternativa para compor sistemas detergentes para limpeza de superfícies de aço inoxidável. A presença de BS melhorou remoção de gordura das superfícies conforme se aumenta a concentração desse composto no sistema de lavagem. Além do mais, a presença de lipase associada ao BS ajudou a aumentar a eficácia da limpeza. Apesar de os resultados não superarem os obtidos pelos surfactantes comerciais, esse estudo nos encoraja a aprofundar mais as pesquisas e explorar de forma completa a campo de aplicação.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem imensamente a bolsa de estudo concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências Bibliográficas

- Bäckström, K.; Engström, S. (1988) Removal of triglycerides from hard surfaces by surfactants: an ellipsometry study. *J American Oil Chem Soc* 65 (3), 412-420.
- Barros FFC, Ponezi AN, Pastore GM (2008) Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1071-1078.
- Bird MR, Fryer PJ (1991) An experimental study of the cleaning of surfaces fouled by whey protein. *Food Bioproducts Processing* 69, 13-21.
- Bobbio, AP.; Bobbio, FO. (2001) Química do processamento de alimentos. 2ed. Ed. Livraria Varela, 143p.
- Chateau M-E, Galet L, Soudais Y, Fages J. (2004) A new test for cleaning efficiency assessment of cleaners for hard surfaces. *J Surf Deterg* 7:4, 355-361.
- Chiu MC, Gioielli LA. (2002) Conteúdo da gordura sólida da gordura abdominal de frango, de suas estearinas e de suas misturas binárias com toucinho. *Rev Ciên Tecnol Alimen* 22(2), 151-157.
- Cox, MF. (1986) Surfactants for hard-surface cleaning: mechanisms of solid soil removal. *J Am Oil Chem Soc* 63(4), 559-565.
- Gillham CR, Wilson DI, Fryer PJ, Hasting APM. (1998) Studies in cleaning of whey protein deposits, Fouling and Cleaning in Food Processing, Jesus College, Cambridge University, Cambridge, UK, 271.

- Gillham CR, Fryer PJ, Hasting APM, Wilson DI. (1999) Cleaning-in-place of whey protein fouling deposits: mechanisms controlling cleaning, Food Bioproducts Proc 77(2), 127.
- Gomez Herrera C. (1996) Detergencia: sus principales mecanismos. Grasas Aceites 47: 419.
- Gotoh, K. (2005) The role of liquid penetration in detergency of long-chain fatty acid. J Surf Deterg 8:4, 305-310.
- Ito S, Kobayashi T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Hatada Y (1998) Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. Extremophiles 2: 185-190.
- Karlsson CAC, Wahlgren MC, Traedgaard, AC. (1998) The removal of β -lactoglobulin from stainless steel surfaces at high and low temperature as influenced by the type and concentration of cleaning agent. J Food Proces Engin 21:485-501.
- Krüssmann H, Bercovici R. (1993) Detergency at low temperatures using combinations of nonionic surfactants and medium chain alcohols. Tenside, surfactants, detergents 30:2, 99-103.
- Lawrence A. (1961) The mechanism of detergency. Chem. Ind. 4:1764-1785.
- Morris VL, Arthur D. (1995) The aerospace industry: regulatory impacts on the use of solvent. Met Finish. 93(20).
- Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. Braz J Microbiol 35: 81-85.
- Prazeres JN, Cruz JAB, Pastore GM (2006) Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. Braz J Microbiol 37: 505-509.

- Röhm O. (1913) Verfahren zum reinigen wäschestücken aller art. Germany Patent, 283923. Xin H, Chen XD, Özkan N. (2002) Whey protein based gel as a model material for studying the initial cleaning mechanisms of milk fouling. J Food Sci 67(7), 2702-2711.
- Xin, H.; Chen, X. D.; Özkan, N. (2004) Removal of a model protein foulant from metal surfaces. Bioengineering, Food Natural Prod 50 (8), 1961-1973.

Capítulo 5

**BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A MIXTURE OF BIOSURFACTANT
OBTAINED FROM *B. subtilis* LB5a AND ALKALINE LIPASE
OBTAINED FROM *F. oxysporum* 152B.**

**BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A MIXTURE OF BIOSURFACTANT OBTAINED
FROM *B. subtilis* LB5a AND ALKALINE LIPASE OBTAINED FROM *F. oxysporum*
152B.**

Cedenir Pereira de Quadros^{1}, Marta Cristina Teixeira Duarte², Gláucia Maria Pastore¹*

¹Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil

²Divisão de Microbiologia, CPQBA, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: cdquadros@yahoo.com.br

Phone: +55 19 3521 4090

Fax: + 55 19 6521 3887

Artigo a ser submetido à Revista Brazilian Journal of Microbiologys

CAMPINAS, 2009

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A MIXTURE OF BIOSURFACTANT OBTAINED FROM *B. subtilis* LB5a AND ALKALINE LIPASE OBTAINED FROM *F. oxysporum* 152B.

ABSTRACT

The work set out to investigate the antimicrobial effects of a mixture of a biosurfactant obtained from *B. subtilis* LB5a and alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B (AL/BS mix) on several types of microorganisms and the removal of *Listeria innocua* biofilm from stainless steel plates. The AL/BS mixture had a surface tension value of around 30 mN.m⁻¹ showing that the presence of alkaline lipase did not interfere in the surface activity properties of the tensoactive component. The antimicrobial activity of the AL/BS mix was determined by means of minimum inhibition concentration (MIC) micro-assays. Among all the tested organisms, the presence of the mixture only affected the growth of *B. subtilis*, *B. cereus* and *L. innocua*. The most sensitive microorganism was *B. cereus* was (0.013 mg.mL⁻¹). In addition, the effects of the sanitizer against *L. innocua* attached to stainless steel plates was determined by plate count after vortexing. That method showed that the presence of the BS or AL/BS mix improved the removal of adhered cells in comparison with vortexing done without sanitizer treatment, reducing the count, on average by 0.97 log CFU.cm⁻². However, there was no significant difference between the sanitizers tested and the performance of standard SDS detergents ($p < 0.05$).

Key words: antimicrobial activity, *Listeria innocua*, microbial biofilm, minimum inhibitory concentration, stainless steel surface

RESUMO

Atividades biológicas de uma mistura de biossurfatante de *B. subtilis* LB5a com uma lipase alcalina de *F. oxysporum* 152B.

Neste trabalho, foi proposto investigar os efeitos antimicrobianos contra diversos micro-organismos e a remoção de biofilmes de *L. innocua* aderidas em placas de aço inoxidável utilizando a associação entre biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a e uma lipase alcalina de *F. oxysporum* 152B, denominada de mistura AL/BS. A mistura de AL/BS teve os valores de tensão superficial em torno de 30 mN/m provando que a presença da lipase alcalina não interferiu nas propriedades de atividade superficial do tensoativo. A atividade antimicrobiana da mistura AL/BS foi realizada pelo ensaio quantitativo da concentração inibitória mínima (CIM). Entre todos micro-organismos testados, somente *B. subtilis*, *B. cereus* e *L. innocua* tiveram seus crescimentos afetados pela mistura. O *B. cereus* foi a bactéria mais sensível (CIM 0,013 mg/mL). Em adição, o efeito dos sanitizantes contra *L. innocua* aderidas ao aço inoxidável foi determinado por contagem em placas seguida de vortex. Este método demonstrou que a presença de biossurfatante ou da mistura melhorou a remoção das células aderidas em relação ao tratamento sem sanitizantes, reduzindo a contagem, em média, 0,97 log/cm². Entretanto, não houve diferença significativa entre os sanitizantes propostos e o detergente padrão SDS ($p < 0,05$).

Palavras chave: atividade antimicrobiana, biofilme microbiano, concentração inibitória mínima, *Listeria innocua*, superfície de aço inoxidável

1 INTRODUCTION

Microbial compounds that exhibit pronounced surface and emulsifying activities are classified as biosurfactants. Their use has been focused on environmental applications owing to their diversity, environment-friendly nature, suitability for large-scale production and selectivity. Despite their potential and their biological origin only a few studies have been carried out on their possible applications in biomedical fields. Some biosurfactants are suitable alternatives to synthetic medicines and antimicrobial agents and may be used as safe and effective therapeutic agents (Rodrigues et al., 2006).

Many authors have already described antibiotic effects associated to biosurfactants. The antimicrobial properties of lipopeptide biosurfactants like liquenisin A obtained from *B. licheniformis* BAS50 was reported by Yakimov *et al.* (1995). Recently, the action of the cyclic lipopeptide obtained from *B. licheniformis* 603 against diverse microorganisms has also been reported. It showed growth inhibitory activity mainly against *Corynebacterium variabilis* and *Acinetobacter* sp (Batrakov et al., 2003). An isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 produced a biosurfactant with high antimicrobial activity against the bacteria *B. subtilis*, *S. aureus* and *P. vulgaris*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa*, and also against the phytopathogenic fungi *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *G. virens* and *C. globosum* (Benincasa et al., 2004).

One report refers to surfactin, produced by *Bacillus subtilis* as the first and most well-known member of the biosurfactant lipopeptides (Arima et al., 1968). Antibiotic and membrane potential effects (Béven and Wróblewski, 1997) disturb lipid monolayers and affect biological membranes (Deleu et al., 2005), exerting an effect on the integrity of the lipid membrane with the formation of ion channels (Carillo et al. 2003). Leakage and lysis of lipid membranes (Heerklotz, H.; Seelig, J. 2007) were among the potential applications

of that biosurfactant. The potential of some kinds of lipopeptides to alter surface tension or show antimicrobial activity is directly linked to their molecular structure (Benincasa et al. 2004; Das et al., 2008). Antimicrobial activity of surfactin produced by *B. subtilis* LB5a in cassava waste water has been reported and it was found that all the bacteria tested were susceptible to lipopeptides. *P. aeruginosa* was the Gram-negative bacterium most sensitive to the product and among the Gram-positive bacteria were *M. luteus* and *B. cereus* (Nitschke et al., 2004). Later, tests showed the antibacterial action of the surfactant surfactin of *Bacillus subtilis* LB5a against all strains tested: *S. aureus*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus*, with the *E. faecium* and *M. luteus* the values of MIC were lowest than 1mg.mL^{-1} (Costa 2005).

A considerable number of bacteria are capable of attaching themselves to processing surfaces used in the food industry. Those surfaces include stainless steel, glass, cast iron, polypropylene and Formica. That attachment can start the processes of growth, adherence, and biofilm formation. Microbial biofilms on contact surfaces could lead to contamination with undesirable microorganisms, resulting in food spoilage or transmission of disease (Andrade et al., 1998). *Listeria* sp. is able to grow at refrigeration temperatures as low as -1.5°C , in environments of reduced water activity, in salt concentrations up to 30% and at pH values below 5.0. Those characteristics contribute to its survival under conditions usually used to control the growth of pathogens in food (Teixeira et al., 2008). Thus, in food processing plants it is often considered as an important source of recontamination of foodstuffs and surfaces especially when that microorganism is present as a biofilm (Chavant et al., 2004). Many reports about the removal of microbial adhesion/biofilm from stainless steel surfaces using chemical treatments have been published (Wirtanen et al., 1996; Andrade et al., 1998; Chavant et al., 2004; Somers and Wong, 2004).

Despite the elucidation of various properties of surfactin in the 60's, it was only in the 80s that researchers dedicated attention to finding an attractive alternative to replace synthetic surfactants that may show marked toxicity and can cause significant environmental pollution (Cserháti et al., 2002).

The objective of this work was to investigate the antimicrobial effects of original mixtures of the biosurfactant from *B. subtilis* LB5a and alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B, on the growth of various microorganisms in liquid medium using minimum inhibitory concentration (MIC) assays; and their efficacy in the removal of *Listeria innocua* biofilm from stainless steel surfaces.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Biosurfactant (BS) production

Bacillus subtilis LB5a from Biochemistry Laboratory Culture Collection (FEA, Unicamp, Brazil) was inoculated in cassava waste water in a Mobile Pilot Plant Fermentor MP 80 (New Brunswick, Edison, NJ, EUA) under the following conditions: 35°C, 150 rpm and aeration 20 L.h⁻¹. The biosurfactant produced was recovered from medium by foam formed during the fermentation. The isolated from liquefied foam was carried out by precipitation in pH 2.0 using 6 N HCl and keeping it at 4°C overnight and centrifuged. The biosurfactant was extracted from precipitated with chloroform/methanol 65:15 and dried (Barros *et al.*, 2008).

2.2 Determination of surface tension activity

The measurement of surface tension (ST) was carried out in K-12 tensiometer (Krüss Processor Tensiometer, Hamburg, Germany) using the plate method platinum-

iridium called Wilhelmy with $40 \times 19.9 \times 0.1$ mm under the following conditions 10 mL sample and temperature between 20 – 25°C (Ramé, 1997).

2.3 Critical micelle dilution (CMD) measurement

CMD⁻¹ and CMD⁻² were done by measuring the surface tension, according to described above, of 10-times and 100-times diluted solution of biosurfactant in distilled water (Barros et al., 2008; Makkar and Cameotra 1997).

2.4 Alkaline lipase (AL) production

The *F. oxysporum* 152B was cultivated for 96 h at 30°C in a YMA medium containing (g.L⁻¹): peptone 5.0, glucose 10.0, malt extract 3.0, yeast extract 3.0, agar 20.0. One piece of 2 cm² from this culture was transferred to a 250 mL-Erlenmeyer flasks with 20 mL of liquid medium, containing (g.L⁻¹): olive oil 10.0, peptone 15.0, yeast extract 5.0, K₂HPO₄ 3.0, MgSO₄.7H₂O 0.4, pH 6.0; homogenized with a T18 basic ultra-turrax homogenizer (IKA[®] Works, Inc., Wilmington, USA) and incubated at 30°C, 160 rpm for 24 h. For the lipase production, 1 mL of this pre-inoculum was transferred to 50 mL of fresh medium and incubated for more 96 h in the same conditions. The fermented medium was chilled to 4°C and the supernatant, separated from the mycelia by filtration, was fractionated with ammonium sulphate at 80% saturation. After centrifugation at $9.500 \times g$ (J2-21, Beckman Centrifuge, USA), the so-called dried extract was prepared after dialyzing the precipitate with cellulose membrane (Membra-Cell MD 44-14, Viskase Companies, Inc., Illinois, USA) against distilled water at 4°C and freeze-dried (Prazeres et al., 2006).

2.5 Alkaline lipase/biosurfactant mixture (AL/BS mix) preparation

The lyophilized lipase was dissolved in 50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 buffer and filtrated through 0.22 µm membrane filter (Millex GV 33 mm, Millipore, Ireland). The powdered biosurfactant was dissolved in distilled water and autoclaved at 121°C for 15 min. Mixtures (AL/BS mix) with different concentrations using both compounds were made under sterile conditions and had the surface activity measured according described above. These solution stocks were kept in sterile glass vials for the following assays.

2.6 Microorganisms strains for antimicrobial assays

The tests organisms *Escherichia coli* CCT 0547, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Bacillus subtilis* CCT 2576, *Staphylococcus aureus* CCT 2740, *Micrococcus luteus* CCT 2692, *Rhodococcus equii* CCT 0541, *Salmonella choleraesuis* CCT 4296 and *Candida albicans* ATCC 10231 were obtained from Culture Collections of the Microbiology Laboratory at CPQBA (Unicamp, Brazil). *Serratia marcescens* CCT 0710, *Bacillus cereus* ATCC 10876 from André Tosello Foundation (Campinas, Brazil) and *Listeria innocua* ATCC 33090 was supplied by Hygiene Laboratory at FEA-Unicamp, Brazil.

2.7 Innoculum preparation

Microorganisms tests strains were cultured in slant Nutrient Agar, Brain Heart Infusion (BHI) or Sabouraud 4% dextrose agar (all Merck®) at 37 °C for 24 h. One loop from microorganism was transferred in 4 mL of saline solution 0.9%. Two milliliters were take out and had it optical density adjusted in spectrophotometer (UV-VIS Mini 1240, Shimadzu) between 0.08 to 0.1 Abs at 625nm (10⁸ CFU.mL⁻¹ according to McFarland

turbidity standards). After that, dilutions were made until 10^5 CFU.mL⁻¹ using the Mueller-Hinton Broth medium (MHB) for bacteria, except *L. innocua* that was used BHI broth. In case of *C. albicans* the medium was RPMI 1640 (Cultilab).

2.8 Minimum inhibitory concentration (MIC) test (CLSI, 2005)

One hundred microliters of inoculum were inoculated in 96-well microtitre plates containing serially diluted AL/BS mix in media MHB, RPMI or BHI. The same tests were performed simultaneously for negative control (only medium), growth control (medium + test organism) and sterility control (medium + AL/BS mix). Plates were incubated under normal atmospheric conditions at 37°C for 24 h. Twenty-five microliters of 0.1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Merck®) were inoculated on bacteria plates and incubated in the same conditions for 3 h. The intensity red color indicates the growth of organism. For *C. albicans*, the change of color from RPMI 1640 medium from pink to yellow indicates the growth of the yeast. MIC is the minimum concentration of an antimicrobial compound at which it inhibits the growth of microorganism.

2.9 Effect of AL/BS mix on biofilm of *L. innocua*

L. innocua suspension was performed according to procedure described in 2.7 section. The surface used was AISI 304 stainless steel with a total surface area of 1 cm² vigorously washed by brushing. After rinsing three times in 100 mL of distilled water, cleaned by immersion in hexane, coupons were placed into Petri dishes and autoclaved at 121°C for 15 min (Parizzi et al., 2004). The biofilm was prepared by submerging the sterile coupons into well microtitre plates with 0.3 mL of inoculum plus 2.7 mL of BHI medium

with a final concentration of 10^3 UFC.mL⁻¹, and incubated at 30°C for 24 h. The control was carried with only culture media (3 mL) (Pizzolitto et al., 2001) After that, the coupons were rinsed with 10 mL of sterile PBS (g.L⁻¹ of distilled water: NaCl 7.65, anhydrous Na₂HPO₄ 0.724, KH₂PO₄ 0.21, pH 7.4) for elimination the unattached cells and placed into tubes containing 5 mL of 2 mg.mL⁻¹ of BS or AL/BS mix (2 mg.mL⁻¹ each) for 10 min at 30 ± 2°C. Then, the coupons were rinsed again with 10 mL of PBS for elimination of the excess of product for 1 min and transferred to 5 mL for new PBS and vortexed for 2 min for release sessile cells from the coupons. To determine viable cells, 1 mL of suspension of sessile cells was serially diluted with peptone water and cultured in BHI agar plate at 30°C for 24 h (Miyano et al., 2003). The control group was performed using distilled water instead of the product. The results were expressed as a logarithm (log CFU.cm²) of reminiscent cells on the coupons.

2.10 Statistical analysis

The mean value and respective standard error for each replicate were calculated by the software Microsoft[®] Excell 2000. The Tukey test was performed using the software SAS[®] System for Windows (SAS Institute Inc. Release 8.02 TS Level 02M0), considering a *p*-value of 5%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biosurfactant stability

Table 1 shows the effect of alkaline lipase on the surface activity of the AL/BS mix. The stability of microbial surfactant can be seen in all treatments with different

concentrations of lipase confirmed by ST values around 30 mN.m⁻¹ in accordance with previously related data (Nitschke et al., 2004, Barros et al., 2008).

Table 1. Effect of different alkaline lipase concentrations on surface activity of the biosurfactant.

	Ratio	ST (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN.m ⁻¹)
Control	-----	30.51	31.90	38.91
	4:1	29.85	31.42	38.31
	2:1	29.76	31.62	37.54
AL/BS mix	1:1	29.90	31.56	38.16
	0.5:1	30.00	31.87	38.22
	0.25:1	29.45	31.19	37.89

Control: lipase-free assay, AL/BS mix: alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B and biosurfactant from *B. subtilis* LB5a mixture. BS concentration in ST (superficial tension) was 1 mg.mL⁻¹. ST, CMD⁻¹ and CMD⁻² (critical micelle dilution) values have standard deviations of 10 measurements ≤ 0.2 .

Regardless of the ratio between lipase and biosurfactant, the CMD⁻¹ and CMD⁻² values are the same as in the values of the control group where only BS is present. The data underscore the fact that the biosurfactant from *B. subtilis* LB5a is resistant to treatment with enzymes as was demonstrated in a previous study (Costa, 2005).

3.2 Minimum inhibitory concentration (MIC)

The results of antimicrobial activity from BS and AL/BS mix against several microorganisms are shown in Table 2.

Among the Gram-positive bacteria, only *B. subtilis*, *B. cereus* and *L. innocua* had their growth affected by the presence of the biosurfactant. In the case of *B. subtilis*, the presence of alkaline lipase decreased the MIC value in comparison with the value for biosurfactant alone from 1.75 to 0.75 - 1.0 mg.mL⁻¹. The most sensitive bacterium was *B.*

cereus (0.013 mg.mL⁻¹), but with the presence of lipase concentrations of 1:1 and 0.5:1 the MIC increased to 0.026 mg.mL⁻¹. The presence of lipase does not appear to have influenced the action of the biosurfactant on *L. innocua* (MIC 1.75 – 2.0 mg.mL⁻¹).

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) tests for AL/BS mix (mg.mL⁻¹)

Microorganisms	BS	AL/BS mixture				
		4:1	2:1	1:1	0.5:1	0.25:1
Gram-negative Bacteria						
<i>E. coli</i>	*	*	*	*	*	*
<i>S. marcescens</i>	*	*	*	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	*	*	*	*
Gram-positive Bacteria						
<i>B. subtilis</i>	1.75	1.0	0.75	0.75	1.0	1.0
<i>S. aureus</i>	*	*	*	*	*	*
<i>M. luteus</i>	*	*	*	*	*	*
<i>B. cereus</i>	0.013	0.013	0.013	0.026	0.026	0.013
<i>S. choterasuis</i>	*	*	*	*	*	*
<i>L. innocua</i>	2.0	2.0	2.0	1.75	2.0	1.75
<i>R. equii</i>	*	*	*	*	*	*
Yeast						
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*

(*) means > 5.0 mg.mL⁻¹ of biosurfactant. (x:y) means the ratio between alkaline lipase and biosurfactant. BS: biosurfactant from *B. subtilis* LB5a, AL/BS mix: alkaline lipase from *F. oxysporum* 152B and biosurfactant mixture.

Comparing with the MICs values to published standards antibiotic as chloramphenicol following 4.0 and 2.0 ug.mL⁻¹ for *B. subtilis* and *B. cereus* (Costa, 2005).

The Gram-negative bacteria were not susceptible to treatment with BS or AL/BS mix, nor was the yeast *C. albicans*.

The biological properties of lipopeptide have been widely reported and since the 60's the biological activities of the biosurfactants have also been reported (Arima et al., 1968). The antibiotic activities of surfactin and lichenysin A from *B. licheniformis* BAS50 were compared and 15 µg of both surfactants were used. The lipopeptide lichenysin A inhibited the growth of most of the bacteria tested on nutrient agar plates, but that inhibition was less than that observed with surfactin (Yakimov et al., 1995). A comparison was made between the antimicrobial activity in Petri dishes of lipopeptide of *B. subtilis* LB5a purified by adsorption chromatography and that of commercial surfactin. The purified surfactant strain LB5a shows itself to be more effective on its own than commercial surfactin (200 ug) against all tested microorganisms, except for *B. subtilis* which did not show susceptibility in the test. *P. aeruginosa* was the most sensitive bacterium, whereas *E. coli*, *S. choleraesuis* and *S. marcescens* were inhibited to a lesser degree. The lipopeptide also affected the growth of *M. luteus* and *B. cereus* (Nitschke et al., 2004). The *B. subtilis* LB5a biosurfactant, produced on a smaller scale, was tested against several microorganisms, including the Gram-positive *E. faecium* and *M. luteus*, which were inhibited at concentration of 0.8 and 0.25 mg.mL⁻¹ of the purified biosurfactant, respectively (Costa, 2005). The biosurfactant isolated from marine strain of *Bacillus circulans* was tested for antimicrobial action against several pathogenic and semi-pathogenic organisms. Using solvent-extracted biosurfactant at a concentration of 1 mg/ml, the authors observed the susceptibility of Gram-positive and Gram-negative organisms and the larger halos were observed for gram-positive *Micrococcus flavus*, *Bacillus pumilis* and *Mycobacterium*

smegmatis. The MIC were found using the agar disc diffusion method for different concentrations of HPLC purification product in many tested strains (Das et al., 2008).

Results showed that ion-conducting pores can be formed by surfactin in artificial lipid membranes. Those results demonstrate that surfactin produces selective cationic channels in lipid bi-layer membranes and suggest that at higher salt concentration, a dimer is involved in that functional channel-forming process (Sheppard et al., 1991). Another study reports that given its amphiphilic character, it is presumed that the biological activity is a direct consequence of the interaction of surfactin with its target membrane and the alteration of the bi-layer properties. More specifically, it seems clear that those properties are mainly related to its ability to alter membrane integrity by establishing strong interactions with the phospholipid membrane constituents. Studies on the molecular mechanisms effects of surfactin showed that the compound has the ability to alter membrane permeability leading to the loss of the internal vesicular contents through local destabilization of lipid packing, or “pore” formation (Carrillo et al., 2003).

There is good evidence that the membrane barrier properties are likely to be damaged in the areas where surfactin oligomers interact with the phospholipids at concentrations far below the onset for solubilization. That will cause structural fluctuations that may well be the primary mode of the antibiotic action and the other important biological effects of that lipopeptide.

That type of peptide acts rapidly on membrane integrity rather than on other vital processes and might perhaps constitute the next generation of antibiotics (Goldberg 2001).

3.3 Effect of AL/BS mix on removal of *L. innocua* biofilm from stainless steel

The data in Table 3 shows the log of the number of *L. innocua* that remained on the stainless steel surface after 10 minutes of sanitizer exposure as determined by the plate count method after vortexing.

Table 3. Number of *L. innocua* remaining on the stainless steel plates after treatment with sanitizer solutions.

Treatments	Log (CFU.cm ⁻²)
Control	6.74±0.24 ^a
Distilled water	5.86±0.29 ^b
BS	4.95±0.43 ^c
AL/BS mix	5.02±0.49 ^c
SDS	4.70±0.40 ^c

BS (biosurfactant from *B. subtilis* LB5a), AL/BS mix(alkaline lipase from *F. oxysporum*/biosurfactant mixture 1:1), SDS (sodium dodecyl sulphate 1%). Different letters means there are statistical differences (p<0.05)

Before the treatment solutions were applied the formation time of *L. innocua* biofilm on the plates was studied. The number of *L. innocua* cells irreversibly attached was a function of incubation time and increased as the bacteria population increased in the BHI broth. After 24 h, the population reached 6.34 ± 0.10 log CFU/cm² and did not increase any further (data not shown). Final pH of inoculum in the formation of biofilm was 6.0.

Significant differences ($p < 0.05$) were not observed after treatment of adhered cells with the BS and AL/BS mix. Compared with the positive control used in the tests, it was observed that the BS and AL/BS mix were as effective as SDS in removing cells from

stainless steel plates ($p < 0.05$), although smaller numbers of viable cells were obtained after the treatment with SDS. On average, the presence of sanitizer solution decreased the count of bacteria remaining on the plates by 0.97 log (1.16 for SDS, 0.91 for BS and 0.84 for AL/BS mix log) in comparison to those without sanitizer treatment, indicating that the presence of alkaline lipase in the mixture had not influenced the results.

Several other studies have shown that many cells adhered on surface are not released by vortexing. Those cells are considered irreversibly attached. In this research, it was observed that the number of irreversibly attached cells increased with contact time as the number of cells in BHI broth increased (Andrade et al., 1998).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the National Research and Development Council (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq) for the financial support it provided and gratefully acknowledge Luciana Maria Ramires Esper M.Sc. for the stainless steel plates provided and the valuable explanations about the biofilm method.

REFERENCES

1. Andrade, N.J.; Bridgeman, T.A.; Zottola, E. A. (1998). Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J. Food Protect.* 61, 833-838.
2. Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Communications.* 31 (3), 488-494.

3. Barros, F.F.C.; Ponezi, A.N.; Pastore, G.M. (2008). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1071-1078.
4. Batrakov, S.G.; Rodionova, T.A.; Esipov, S.E.; Polyakov, N.B.; Sheichenko, V.I.; Shekhovtsova, N.V.; Lukin, S.M.; Panikov, N.S.; Nikolaev, Y.A. (2003). A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Biochim. Biophys. Acta* 1634, 107-115.
5. Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85, 1-8.
6. Béven, L.; Wróblewski, H. (1997). Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res. Microbiol.* 148, 163-175.
7. Carrillo, C.; Teruel, J.A.; Aranda, F.J.; Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta.* 1611, 91-97.
8. Chavant, P.; Gaillard-Martinie, B.; Hébraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 241-248.
9. Costa, G.A.N. (2005). *Produção biotecnológica de surfatante de Bacillus subtilis em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações*. São Paulo, Brasil, 87p. (M.Sc. Dissertation. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp).
10. Cserhádi, T.; Forgács, E.; Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ.l Int.* 28, 337-348.

11. Das, P.; Mukherjee, S.; Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111,.
12. Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Coll. Interf. Sci.* 283, 358-365.
13. Goldberg, J. (2001). Cyclic peptide antibiotics; self-assembly required. *Trend. Microbiol.* 9, 412.
14. Heerklotz, H.; Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J.* 36, 305-314.
15. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microb. Biotech.* 18, 37-42.
16. Miyano, N.; Oie, S.; Kamiya, A. (2003). Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. *Biol. Pharm. Bull.* 26 (5), 671-674.
17. Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.V.; Eberlin, M.N.; Höehr, N.F.; Pastore, G.M. (2004). Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. *Food Sci. Biotechnol.* 13 (5), 591-596.
18. Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, G.M. (2004). Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.* 35, 81-85.
19. Parizzi, S.Q.F.; Andrade, N.J.; Silva, C.A.S.; Soares, N.F.F.; Silva, E.A.M. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz. Archives of Biology and Technology.* 47 (1), 77-83.

20. Pizzolitto, E.L.; Pizzolitto, A.C.; Pozetti, G.L. (2001). Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. *Braz. J. Microbiol.* 32, 340-344.
21. Prazeres, J.N.; Cruz, J.A.B.; Pastore, G.M. (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol.* 37, 505-509.
22. Ramé, E. (1997). The interpretation of dynamic contact angles measured by the Wilhelmy plate method. *J. Coll. Interf. Sci.* 185, 245-251.
23. Rodrigues, L.; Banat, I.M.; Teixeira, J.; Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 57, 609-618.
24. Sheppard, J.D.; Jumarie, C.; Cooper, D.G.; Laprade, R. (1991). Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1064, 13.
25. Somers, E.B.; Wong, A.C.L. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J. Food Protection.* 67 (10), 2218-2229.
26. Teixeira, P.; Lima, J.; Azeredo, J.; Oliveira, R. (2008). Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 1239-1244.
27. Wirtanen, G.; Husmark, U.; Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilm after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J. Food Protect.* 59, 727-733.

28. Yakimov, M.M.; Timmis, K.N.; Wray, V.; Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5), 1706-1713.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Este trabalho mostrou que é possível a união de dois compostos produzidos pelo uso da biotecnologia, uma lipase alcalina de *Fusarium oxysporum* e um biossurfatante de *Bacillus subtilis*; em uma mesma mistura;
- ✓ A lipase permaneceu ativa na presença da concentração do biossurfatante estudada, assim como este manteve suas propriedades tensoativas frente à enzima alcalina;
- ✓ A mistura se mostrou estável quando submetida a diferentes condições de tratamento;
- ✓ A mistura foi hábil para remover o material lipídico impregnado em tecidos de algodão em sistemas detergentes;
- ✓ A mistura melhorou o percentual de remoção de diferentes gorduras depositadas em superfície rígida de aço inoxidável;
- ✓ A mistura apresentou atividade antimicrobiana para os micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Listeria innocua*, pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços;
- ✓ A mistura foi capaz de remover biofilme de *L. innocua* de placas de aço inoxidável.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados aqui apresentados sugere-se:

- ✓ Aumentar a escala de produção da lipase para biorreatores de bancada com maiores capacidades;
- ✓ Aumentar o grau de purificação tanto da enzima como do biossurfatante;
- ✓ Fazer uso da metodologia de planejamento e otimização de processos para avaliar os parâmetros dos sistemas de lavagem de forma conjunta;
- ✓ Elaborar uma formulação detergente contendo lipase e biossurfatante;
- ✓ Executar estudos “in locu” da aplicação do detergente enzimático;
- ✓ Aprofundar os estudos na atividade antimicrobiana do biossurfatante e da mistura LA/BS;
- ✓ Realizar testes toxicológicos da mistura LA/BS;
- ✓ Procurar e firmar parcerias com indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas para novos projetos e ampliação no campo de aplicação das enzimas microbianas e do biossurfatante.

