



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PRAC
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Humberto Bezerra de Souza Sobrinho

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Candida
sphaerica***

**RECIFE
2007**

Humberto Bezerra de Souza Sobrinho

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA A
PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR *Candida
sphaerica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof.^a Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

RECIFE

2007

S729u

Souza Sobrinho, Humberto Bezerra de

Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida Sphaerica* / Humberto Bezerra de Souza Sobrinho ; orientador Leonie Asfora Sarubbo ; co-orientador Alexandra Amorim Salgueiro, 2007.

99 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica, 2007.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos industriais. 3. Microorganismos. I. Sarubbo, Leonie Asfora. II. Salgueiro, Alexandra Amorim. II. Título.

CDU 579.66

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE

Profa. Dra. Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

DEDICATÓRIA

A Deus

À minha esposa Lúcia

Às minhas filhas Renata e Letícia que fazem de mim um homem cada dia mais feliz.

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, amiga e dedicada, símbolo de sabedoria, que acreditou no meu trabalho e na minha vontade de aprender, superando as minhas dificuldades.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, que além dos ensinamentos científicos, passou tranquilidade e admiração.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, que me deu a oportunidade de participar da seleção, dando votos de confiança para a realização deste trabalho.

A todos os companheiros do NPCIAMB, pela paciência, compreensão e dedicação e, em especial, a Raquel Diniz Rufino, Juliana Moura de Luna e Charles Bronzo Barbosa Farias, que me ajudaram nos experimentos com paciência, sabedoria, humildade e dedicação.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela paciência, orientação, amizade, troca de conhecimentos e aprendizado.

À Nicéas Izabel Alves, secretária da Pós-Graduação pela atenção e gentileza no atendimento prestado durante o curso.

À Sônia Maria de Souza, secretária do NPCIAMB, e aos técnicos Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim de Santana.

À Profa. Dra. Arminda Saconi Messias, Coordenadora Geral de Pesquisa da Universidade Católica de Pernambuco, pela gentil e valiosa contribuição prestada ao trabalho.

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J. pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB.

SUMÁRIO

	página
AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1.....	13
1.1 Introdução.....	13
1.2 Objetivos.....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
1.3 Revisão de Literatura.....	16
1.3.1 Biossurfactantes.....	16
1.3.1.1 Classificação.....	17
1.3.1.2 Microrganismos produtores.....	18
1.3.1.3 Propriedades e aplicações.....	22
1.3.1.4 Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes.....	24
1.3.1.5 Perspectivas de utilização.....	26
1.4 Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2.....	37
Utilização de dois resíduos agroindustriais para a produção de surfactante por <i>Candida sphaerica</i> UCP0095.....	37
2.1 Resumo.....	38
2.2 Abstract.....	39
2.3 Introdução.....	40
2.4 Material e métodos.....	41
2.4.1 Microrganismo.....	41
2.4.2 Reagentes e Substratos.....	41
2.4.3 Meios de cultura.....	42
2.4.4 Preparação do inóculo.....	43
2.4.5 Produção do biossurfactante.....	43

2.4.6 Determinação de biomassa.....	43
2.4.7 Determinação de proteínas.....	44
2.4.8 Determinação enzimática de lipases.....	44
2.4.9 Determinação da atividade de emulsificação.....	45
2.4.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeito do pH, da adição de NaCl e da temperatura).....	46
2.4.11 Isolamento do biossurfactante.....	46
2.4.12 Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC).....	47
2.4.13 Caracterização do biossurfactante.....	47
2.4.14 Cromatografia de camada delgada.....	48
2.4.15 Potencial para biorremediação.....	48
2.4.16 Determinação da carga iônica do biossurfactante.....	49
2.5 Resultados e Discussão.....	49
2.5.1 Seleção da melhor condição de produção do biossurfactante.....	49
2.5.2 Cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante selecionado.....	51
2.5.3 Produção de lipases.....	52
2.5.4 Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação.....	55
2.5.5 Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC).....	59
2.5.6 Caracterização do biossurfactante.....	60
2.5.7 Aplicação do biossurfactante na remoção de óleo adsorvido em solo.....	61
2.6 Conclusões.....	62
2.7 Agradecimentos.....	62
2.8 Referências.....	62
CONCLUSÕES GERAIS.....	82
ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

	página
Capítulo 1	
Figura 1 – Monômero surfactante.....	16
Figura 2 - Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC).....	17
Capítulo 2	
Figura 1 - Curvas de crescimento, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante isolado de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina.....	74
Figura 2 - Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina.....	75

LISTA DE TABELAS

	página
Capítulo 1	
Tabela 1 – Tipo e origem microbiológica dos biossurfactantes (MULLIGAN, GIBBS, 1993).....	19
Tabela 2 – Tensões superficiais e substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de <i>Cândida</i> e tensões superficiais de surfactantes sintéticos.....	20
Tabela 3 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	24
Tabela 4 – Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes.....	27
Capítulo 2	
Tabela 1 – Composição do resíduo de refinaria de óleo de soja utilizado na produção do biossurfactante por <i>Candida sphaerica</i>	76
Tabela 2 - Tensão superficial, biomassa e rendimento dos biossurfactantes produzidos por <i>Candida sphaerica</i> cultivada em presença de resíduos industriais como substratos durante 144 horas.....	77
Tabela 3 - Atividade lipolítica específica do líquido metabólico livre de células de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo e 2,5 % de milhocina.....	78
Tabela 4 - Influência da adição de NaCl na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do biossurfactante, avaliadas através da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina.....	79
Tabela 5 - Influência da temperatura na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do biossurfactante, avaliadas através da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina.....	80
Tabela 6 – Influência do pH na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do biossurfactante, avaliadas através da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina	81

RESUMO

Os surfactantes são poderosos agentes anfipáticos de aplicação em indústrias petrolíferas, alimentícias e farmacêuticas, entre outras. Muitos tipos de surfactantes quimicamente sintetizados são hoje utilizados, embora o desenvolvimento de produtos alternativos, biodegradáveis e menos tóxicos, como os chamados biossurfactantes, agentes obtidos por via microbiológica, torna-se uma estratégia importante na obtenção de componentes mais compatíveis com o meio ambiente e na ampliação das propriedades específicas e aplicações desses compostos. Muitos biossurfactantes têm sido produzidos, embora poucos sejam comercializados em virtude do alto custo de produção e dos processos de purificação. Neste trabalho, estudou-se a possibilidade de co-utilização de dois resíduos industriais, milhocina e resíduo de refinaria de óleo vegetal de soja como nutrientes de baixo custo para a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*. A levedura foi inicialmente cultivada em água destilada suplementada com milhocina e resíduo de refinaria de óleos vegetais em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram redução da tensão superficial do meio para 26 mN/m, com rendimento de 4,5 g/L em biossurfactante isolado após 144 horas de cultivo na presença de 5,0 % do resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina. O biossurfactante foi caracterizado como um glicolípido composto por 75 % de lipídeos e 25 % de carboidratos. O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido foi submetido a estudos de estabilidade frente à tensão superficial e atividade de emulsificação. O biossurfactante apresentou-se estável como agente de superfície sob condições extremas de pH, temperatura e após adição de elevadas concentrações de cloreto de sódio, podendo também ser utilizado como emulsificante de hidrocarbonetos específicos. O biossurfactante demonstrou um baixo valor de concentração micelar crítica (0,08 %) e potencial de aplicação na biorremediação, demonstrado pela remoção de 65 % de óleo de motor adsorvido em areia contaminada. Em função da capacidade de redução da tensão superficial e da utilização de resíduos industriais, o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* apresenta grande potencial de aplicação em processos industriais e ambientais.

Palavras-chave: biossurfactante, *Candida sphaerica*, resíduos industriais.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic agents with application in different industries, such as the petroleum, food and pharmaceutical. Many kinds of chemical surfactants are being used nowadays, although the development of alternative products, with biodegradable nature and lower toxicity, as the so called biosurfactants, metabolites from microorganisms, is a sound strategy for the obtention of compounds with ecological acceptability and for the knowledge of specific properties and applications of these compounds. Different biosurfactants have been produced, but few are being commercialized due the production costs regarding the utilization of high cost substrates and the purification techniques. In this work, the possibility of co-utilization of two industrial residues (refinery residue and corn steep liquor) as low-cost substrates for biosurfactant production by *Candida sphaerica* was investigated. The yeast was cultivated in distilled water supplemented with refinery residue and cornsteep liquor in different concentrations. The results showed a reduction of the medium surface tension to 26 mN/m, with a yield of 4.0 g/L of isolated biosurfactant after 144 hours in medium containing 5.0 % refinery residue and 2.5 % cornsteep liquor. The biosurfactant was characterized as an anionic glycolipid composed of 75 % lipids and 25 % carbohydrates. The metabolic broth free of cells containing the crude biosurfactant was submitted to stability studies related to the surface tension and to the emulsification activity. The biosurfactant showed stable capacity to reduce the surface tension under extreme conditions of pH, temperature and under addition of high sodium chloride concentrations. The biopolymer can also be applied as emulsifier for specific hydrocarbons, considering the importance of the conditions of application. The biosurfactant showed a low micellar critical concentration value (0.08 %) and potential of application in soil bioremediation, which was showed throughout the motor oil removal of 65 %. Regarding the low surface tension associated to the use of industrial residues, the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* shows great potential of application in industrial and environmental processes.

Key-words: biosurfactants, *Candida*, industrial residues.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água. A porção apolar é, freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (BANAT, 1995). Estas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões onde os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água ou onde a água possa se solubilizar em hidrocarbonetos (RON; ROSENBERG, 2001). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

A utilização dos surfactantes se concentra nas indústrias de produtos de limpeza (sabões e detergentes), petróleo, cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes para uso doméstico. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (LIN, 1996).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores combinada a novas legislações de controle do meio ambiente têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (BANAT, 1995; MAYER, SOBERON-CHAVEZ, 2000; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (ROSENBERG, 1986).

Paralelamente, a Biotecnologia permitiu ampliar os limites de aplicação dos aditivos sintéticos, desenvolvendo novos produtos baseados na capacidade sintética dos microrganismos. Estas perspectivas, relacionadas a produtos de elevado interesse

industrial, têm conduzido a investigação e o desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de agentes surfactantes por microrganismos (ROSENBERG, 1986; STAMPFLI; NERSTEN, 1995).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (REDDY, 1995).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis (BANAT, 1995).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com os similares sintéticos (CANET et al., 2002).

Nesse sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e conseqüente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial. Os substratos de baixo custo, a seleção de microrganismos superprodutores e o aprimoramento dos processos de purificação têm sido utilizados com essa finalidade (DELEU; PAQUOT, 2004).

Portanto, o presente trabalho foi desenvolvido visando produzir agentes surfactantes a partir de *Candida sphaerica* utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo, através do estudo da cinética de crescimento e de produção, bem como pelo estudo das propriedades do biossurfactante obtido, seu isolamento, caracterização preliminar e sua aplicação na remoção de óleo adsorvido em solo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Produzir agentes surfactantes por *Candida sphaerica* através da utilização de dois resíduos industriais, milhocina e resíduo de refinaria de óleo de soja, como substratos de baixo custo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos substratos na produção de biossurfactante;
- selecionar a melhor condição de cultivo para produção de biossurfactante;
- determinar a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante selecionado;
- isolar o biossurfactante e determinar o rendimento de produção;
- investigar a produção de lipase durante o cultivo do microrganismo;
- caracterizar físico-quimicamente o biossurfactante;
- determinar a carga iônica do biossurfactante;
- caracterizar o biossurfactante quanto à estabilidade frente a condições ambientais específicas;
- avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante na biorremediação.

1.3 Revisão de Literatura

1.3.1 Biossurfactantes

Os surfactantes constituem um grupo de agentes que atua nas superfícies através da capacidade em reduzir a tensão superficial e interfacial dos líquidos. Os chamados biossurfactantes são compostos biológicos produzidos por uma grande variedade de microrganismos procariontes e eucariontes. Assim como seus similares sintéticos, possuem em sua estrutura molecular porções hidrofílicas (polares) e hidrofóbicas (apolares), sendo por isso considerados moléculas anfipáticas que permitem a formação de estruturas especializadas, vitais à sua ação (SINGH et al., 2007). A parte polar ou hidrofílica de um surfactante é conhecida geralmente como a “cabeça” e a parcela hidrofóbica ou apolar é conhecida como a “cauda” (HABA et al., 2000; KIM et al., 2000; GOUVEIA et al., 2003; MANEERAT, 2005). A Figura 1 ilustra a estrutura simplificada de um surfactante.

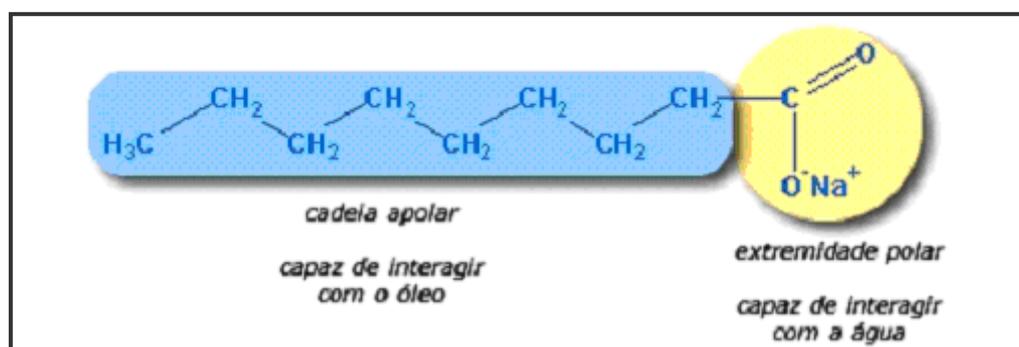


Figura 1 – Monômero surfactante

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.net>

A tensão superficial é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 2). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (MULLIGAN, 2005; PIRÔLLO, 2006; RUFINO, 2006).

A CMC é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante podendo ser definida, também, como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa (RUFINO, 2006). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007).

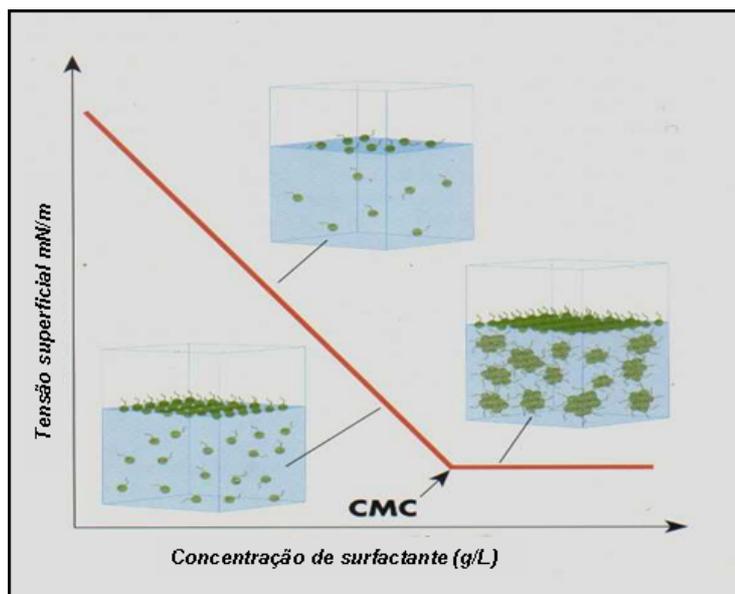


Figura 2 - Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC)

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

1.3.1.1 Classificação

Os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a carga iônica que reside na parte polar da molécula. Em função da presença ou ausência de cargas elétricas, podem ser aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou anfotéricos (MANEERAT, 2005).

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm grupamentos amina. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, um ácido carboxílico ou um álcool (LANG; WAGNER, 1987).

Os biossurfactantes são comumente classificados de acordo com a natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora (DESAI; DESAI, 1993). Quanto à estrutura, podem ser classificados em cinco grandes grupos (BOGNOLO, 1999):

- Glicolipídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos.
- Lipossacarídeos, os quais normalmente possuem massa molar elevada e são solúveis em água, como o conhecido Emulsan, emulsificante extracelular produzido por hidrocarbonetos a partir da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*.
- Lipopeptídeos, como a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, um dos biossurfactantes mais efetivos já relatados na literatura.
- Fosfolipídeos, estruturas comuns a muitos microrganismos, como o biossurfactante de *Corynebacterium lepus*.
- Ácidos graxos e lipídeos neutros (alguns classificados como glicolipídeos) e proteínas hidrofóbicas.

1.3.1.2 Microrganismos produtores

Uma variedade de microrganismos é capaz de produzir biossurfactantes (Tabela 1), com diferentes estruturas moleculares (DELEU, PAQUOT, 2004). Embora o potencial de produção seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam o nível de expressão (RHAMAM et al., 2002).

Entre as leveduras, espécies de *Cândida* têm sido largamente empregadas com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e, conseqüentemente, para produção de biossurfactantes. Cirigliano & Carman (1985) isolaram, inicialmente, um bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares, enquanto que Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *C. lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais. Sarubbo et al. (1999; 2001) também utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo vegetal de babaçu e glicose como substratos.

A *Candida bombicola* tem se destacado como produtora de biossurfactantes. Segundo a literatura, essa levedura apresentou alto rendimento em biossurfactante (67 g/L)

quando este foi produzido a partir de óleo de milho e glicose em fermentador (PERSSON et al, 1999).

Tabela 1 - Tipo e origem microbiológica dos biossurfactantes

Tipo de surfactante	Microrganismo
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i>
Soforolipídeos	<i>Candida lipolytica</i> ,
	<i>Candida bogoriensis</i> ,
	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
Glicolipídeos	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> ,
	<i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i>
	<i>Tsukamurella sp.</i> ,
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter sp.</i> ,
	<i>Capnocytophaga sp.</i> ,
	<i>Penicilium spiculispurum</i> ,
	<i>Corynebacterium lepus</i> ,
Ácidos Graxos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ,
	<i>Talamyces trachyspermus</i> ,
	<i>Nocardia erythropolis</i>

Fonte: MULLIGAN; GIBBS (1993)

Recentemente, Sarubbo et al. (2006) demonstraram a possibilidade de combinação entre duas fontes, uma solúvel e outra insolúvel, para a produção de um biossurfactante por *Candida glabrata*, enquanto que Rufino (2006) aplicou com sucesso um resíduo industrial de óleo de soja na produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica*.

Em estudos com duas espécies de leveduras, *Pichia membranaefaciens* e *Pichia anomala*, cultivadas em meio mineral contendo 2 % de glicerol, ocorreu produção de biossurfactantes. O mesmo não ocorreu quando gasolina e querosene a 2 % foram adicionados como substratos (ARAGÃO et al., 2007).

A Tabela 2 ilustra as tensões superficiais e os substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* e sua comparação frente a surfactantes sintéticos.

Tabela 2 - Tensões superficiais e substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* e tensões superficiais de surfactantes sintéticos

Microrganismo / surfactantes sintéticos	Tensão superficial (mN/m)	Substratos	Referências
<i>Candida albicans</i> 39A2	35	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
	35	Óleo de oliva	
<i>Candida albicans</i>	43	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
	39	Óleo de oliva	
<i>Candida rugosa</i> 1970 IFO0750	39	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
	39	Óleo de oliva	
<i>Candida tropicalis</i> CECT 1440	43	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
	35	Óleo de oliva	
<i>Candida lipolytica</i> CECT 1357	40	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
	43	Óleo de oliva	
<i>Candida torulopsis</i>	40	Óleo girassol	HABA et al., 2000
	45	Óleo de oliva	
		Resíduo vegetal e	RUFINO, 2006
<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	26	ácido glutâmico	
		Óleo de algodão e	LUNA, 2006
<i>Candida glabrata</i> UCP 1002	31	glicose	
		Óleo de canola e	SARUBBO et al.,
<i>Candida lipolytica</i>	31	glicose	2007
Brometo de n-hexadecil Trimetil- amônio (CTBA)	55,0	-	BEHING et al., 2004
Alquilbenzeno sulfonato	47,0	-	BEHING et al., 2004
Lauril – Sulfato de sódio (SDS)	37,0	-	BEHING et al., 2004
Tween 80	45,0	-	BEHING et al., 2004
Tween 20	45,0	-	BEHING et al., 2004

As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* também são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes.

Bacillus subtilis são produtores de lipopeptídeos, como a chamada surfactina, a qual contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila do ácido C14 (KAKINUMA et al., 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005 % reduzem a tensão superficial para 27 mN/m, tornando o surfactina um dos mais poderosos biossurfactantes. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (HUE et al., 2001).

Em 2003, Queiroga e colaboradores utilizaram o *Bacillus subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, observando uma redução de tensão superficial de 53 mN/m para 25,7 mN/m. Wey et al. (2003) identificaram que a adição de ferro em quantidade apropriada ao cultivo de *Bacillus subtilis* 21332 melhorou significativamente a produção de surfactina.

Um grupo de biossurfactantes muito estudado é o de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (HITSATSUKA et al., 1971; GUERRA-SANTOS et al., 1984). Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos desses componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos, incluindo alcanos (C11 e C12) piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo de oliva e glicose (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, pH, composição dos nutrientes, substrato e temperatura utilizada (MULLIGAN; GIBBS, 1993). Gouveia et al. (2003) utilizaram 13 linhagens produtoras de raminolipídeos na investigação da produção de biossurfactantes em meios líquidos contendo glicose e glicerol como fontes de carbono. As bactérias foram capazes de reduzir a tensão do meio de 58 mN /m para 30 mN/m. Mulligan & Gibbs (1990) demonstraram a importância da composição do meio de cultura na produção desses biossurfactantes.

Estudos realizados com *Kocuria rhizophila* mostraram a utilização de sacarose, querosene e óleo de soja como substratos; entretanto, a bactéria não foi capaz de utilizar querosene como fonte de carbono. A produção do biossurfactante aconteceu independente do crescimento celular em meio contendo óleo de soja (UBEDA, 2004).

Em 2005, Maneerat descreveu a produção de microrganismos marinhos como produtores de biossurfactante, empregado na biorremediação, em solo de praias poluídas com óleo.

1.3.1.3 Propriedades e aplicações

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de microrganismos com potencial de produção destes agentes (DELEU; PAQUOT, 2004).

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (ABU-RUWAIDA et al., 1991; STAMPFLI; NERSTEN, 1995):

- atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente;
- tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75 °C, por até 140, horas e pHs entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de sal, enquanto que 2 % de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais;
- biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos;
- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação em vários processos industriais.

As possíveis aplicações nas indústrias de óleos incluem a limpeza de derramamento de óleos, remoção de óleos de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos contaminados ou de efluentes, assim como o aumento geral dos processos de recuperação de óleos de reservatórios ao nível de produção, solos saturados ou na biorremediação de solos (ZHOU; KOSARIC, 1995).

Os surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram bons resultados na remoção de piche em solos contaminados (BOGNOLO, 1999). Já Mulligan et al. (2001) utilizaram surfactina, raminolipídios e soforolipídios na remoção de metais pesados de sedimentos. Kitamoto et al. (2002) viabilizaram o uso de biossurfactante como efetivo agente antiaglomeração no sistema ligamento, observando que o glicolípido de *Candida antarctica* demonstrou ligamento na concentração de 10 mg/L por 8 h.

No setor da cosmética, observou-se uma rápida penetração dos biossurfactantes. Estima-se que num futuro próximo a maioria dos cosméticos seja "biocosméticos". Com essa finalidade, glicolípdeos obtidos de *Torulopsis bombicola* KSM 35 são usados no Japão, como agentes de limpeza facial.

Na agricultura, são utilizados na hidrofilição de solos argilosos para a obtenção de boa umidade e distribuição uniforme de fertilizantes (FIECHTER, 1992; LIN, 1996; ZHOU; KOSARIC, 1995).

Na indústria alimentícia, a emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas. O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas. Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem as indústrias de papel, têxtil e cerâmica (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; HARAYAMA, 1997).

Os biossurfactantes têm sido considerados para várias aplicações biológicas (terapêuticas) como atividade biológica protetora, convertendo antibióticos, atividade fungicida, inseticida e antiviral e inibidores de enzimas (MEYLHEUC et al., 2001).

Na Tabela 3, ilustrada a seguir, é possível visualizar de forma condensada as diversas aplicações dos biossurfactantes.

Tabela 3 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene e cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação do petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)

Fonte: MULLIGAN (2005)

1.3.1.4 Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleo vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizados na produção de muitos metabólicos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima represente o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE et al., 2006). Por outro lado, milhões de desperdícios em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (PANDEY, et al., 2000).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes.

Muitos biossurfactantes têm sido produzidos a partir de substratos agroindustriais, renováveis e de baixo custo. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melaço de cana e glicerina têm sido citados na literatura (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um certo balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídios encontrados são elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (MAKKAR, CAMEOTRA, 1999; MERCADE et al., 1994).

Recentemente, Barros et al. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores desse trabalho, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilização e implantação desses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes para desenvolver condições adequadas no desenvolvimento e produção. Os efluentes do processamento de batata foram evidenciados como substitutos atrativos dos substratos convencionais, uma vez que são fontes de carboidratos na forma de amido e açúcar, de nitrogênio e de carbono, considerando que a composição do meio interfere na redução da tensão superficial.

Nitschke & Pastore (2006) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*.

Anteriormente, Nitschke et al. (2004) selecionaram microrganismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melaço, soro de leite e manipueira obtendo valores de tensão superficial em torno de 26 mN/m. Volbrecht et al. (1999) investigaram a produção de biossurfactantes usando óleo vegetal doméstico como substrato da bactéria *Tsukamurella spec* DSM 44370, conseguindo reduzir a tensão da água de 70 mN/m para 35 mN/m com CMC de 10 mg/L. Haba et al. (2000) compararam o uso de óleo de oliva e girassol para a produção de biopolímeros usando valores de tensão superficial até 40 mN/m como critério de seleção de microrganismos potencialmente produtores. Recentemente, Rufino (2006) utilizou um resíduo de refinaria na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial.

Mukherjee et al. (2006) descreveram o uso de substratos de baixo custo como alternativa econômica e promissora para a produção de biossurfactantes. Derivados de óleo vegetal, substâncias a base de amido, soro de leite, óleo de babaçu e girassol, melaço e

efluente de arroz foram utilizados com eficiência na produção de raminolipídeos e soforolipídeos por vários microrganismos.

Diferentes elementos encontrados nos efluentes dos processos industriais também são fontes de nutrientes. Nitrogênio, e ferro foram utilizados para aumentar o rendimento de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 e *Ustilago maydis* (DUBEY et al., 2004).

Amezcu-Vega et al. (2006) descreveram a importância da relação entre diferentes elementos como C e N, C e P, C e Fe ou C e Mg na produção de biopolímeros e na otimização de seus processos de obtenção.

Recentemente, a borra oleosa do fundo de tanques da Petrobrás, contendo querosene, óleo diesel e petróleo, foi utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado (PIRÔLLO, 2006).

A Tabela 4 mostra um resumo de algumas matérias-primas de baixo custo e os respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes.

1.3.1.5 Perspectivas de utilização

Nas últimas décadas, a produção de biossurfactantes por vários microrganismos tem sido intensivamente estudada, o que permite que se tenha, hoje, uma boa quantidade de dados em relação à sua produção, tipos e propriedades. Apesar de possuir muitas propriedades comercialmente atrativas e claras vantagens em comparação aos seus homólogos sintéticos, a produção de surfactantes microbianos em escala comercial, ainda, não foi completamente atingida devido aos seus baixos rendimentos e altos custos de produção – para isso seria necessário que fossem produzidos e recuperados de forma mais lucrativa e em grande escala.

A economia de produção de todos os metabólicos microbianos é determinada por três fatores básicos: (i) custos da matéria-prima inicial; (ii) disponibilidade de procedimentos adequados e econômicos de produção e recuperação; e (iii), o rendimento de produção dos microrganismos produtores.

Assim, tendo em vista as restrições econômicas à produção de biossurfactantes, foram adotadas três estratégias básicas em todo o mundo para tornar esse processo

Tabela 4 - Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes

Matéria-prima de baixo custo ou resíduos	Tipo de biossurfactante	Espécie microbiana produtora	Rendimento máximo (g/L)
Óleo de babaçu	Glicolípideo	<i>Candida lipolytica</i> IA1055	----
Óleo de milho	Glicolípideo	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	400
Óleo de girassol e óleo de soja	Raminolípideo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31/2,98
Óleo de soja	Lípideo manosileritritol	<i>Candida</i> sp. SY16	95
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	Raminolípideo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2,7
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolípideo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72
Resíduo de refinaria de óleo de girassol	Raminolípideo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Glicolípideo	<i>Candida antarctica</i> e/ou <i>Candida apicola</i>	10,5/13,4
Soro e resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolípideos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	0,92
Efluentes do processamento de batatas	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	---
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e <i>Bacillus subtilis</i> LB5a	2,2 – 3,0

Fonte: MUKHERJEE et al., (2006)

competitivo em termos de custos: (i) o uso de substratos mais econômicos para reduzir os custos da matéria-prima inicial envolvida no processo; (ii) o desenvolvimento de bioprocessos eficazes, incluindo a otimização das condições de cultura e processos de separação eficazes em termos de custo para obter a máxima produção e recuperação de biossurfactantes e (iii) o desenvolvimento e utilização de cepas mutantes ou recombinantes superprodutoras para assegurar maiores rendimentos dos biossurfactantes. As duas primeiras estratégias foram mais exploradas e são consideradas eficazes em aumentar substancialmente a produção de biossurfactantes. A terceira, no entanto, utilizando cepas recombinantes hiperprodutoras ainda não foi devidamente testada, apesar de dados confirmando que os rendimentos foram várias vezes maiores. Esta área da pesquisa dos biossurfactantes ainda se encontra em seus estágios iniciais (MUKHERJEE et al., 2006).

Assim, embora a utilização industrial dos biossurfactantes tenha sido dificultada em virtude dos altos custos de produção associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos dispendiosos, esses custos têm sido significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produto (GALLERT; WINTER, 2002).

A produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 2 a 3 milhões de toneladas/ano, sendo 75 % derivados de plantas. A maioria dos óleos e gorduras é utilizada na indústria alimentícia, a qual gera grandes quantidades de resíduos graxos da extração das sementes oleaginosas. O acúmulo desses resíduos tem aumentado sua utilização para transformação microbiana (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Adicionalmente, a manipulação da composição do meio de cultura tem permitido o aumento da produção (CARRILLO et al., 1996; TULEVA et al., 2002).

Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos oleosos regionais demonstraram a produção desses compostos por espécies de *Candida* (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP 2000, 2004; VANCE-HARROP et al., 2003). Outras pesquisas descrevem a combinação entre óleos vegetais e carboidratos como substratos para a produção de biossurfactantes (DAVILA et al., 1992; ZHOU; KOSARIC, 1993 e 1995; SARUBBO et al., 2006).

Considerando as inúmeras propriedades e a gama de aplicações dos biossurfactantes, o aprimoramento das técnicas existentes, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de produção, através de pesquisas que permitam a redução dos custos de produção e a obtenção de altos rendimentos será possível identificar o uso em potencial dos biossurfactantes a nível industrial e competitivo em todo o mundo (DELEU; PAQUOT, 2004).

1.4 Referências Bibliográficas

ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant- producing bacteria: product characterization and evaluation. **Acta Biotechnologica**. v. 4, p. 315-324, 1991.

ARAGÃO, V. O.; ROCHA, L. L.; ANGELINA, A. L. ; PAES, F. A.; HISSA, D. C.; PINTO, N. W.; MELO, V. M. M. M. ; MARTINS, S. C. S. Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC. 57., **Anais...** Fortaleza: SBPC, 2007.

AMEZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO H. M.; ESPARZA-GARCIA F.; RÍOS RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 237-240, 2006.

BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal : state of the art (review). **Acta Biotechnologica**. v. 15, n. 3, p. 251-267, 1995.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. ; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina : propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 01-14, 2007.

BEHING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I . O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial : um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3 , p. 492-495, 2004.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces A: **Physicochemical Engineering Aspects**. v. 152, p. 41-52, 1999.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 50, p. 520-529, 1998.

CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**. v. 76, p. 113-117, 2002.

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

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 50, p. 846-850, 1985.

DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 6-11, 1992.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**. v. 7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of Biosurfactants. In: Kosaric N (ed). **Biosurfactants: production, properties, applications**. Surfactant Science Series. Marcel Dekker Inc., New York, v. 48, p. 65-97, 1993.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 3, p. 74 – 81, 2004.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**. v. 10, p. 208-217, 1992.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**. v. 89, p. 483-496, 2002.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; SOUZA LIMA, G. M.; ARAUJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 30, p. 39-45, 2003.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, p. 301-305, 1984.

HABA, E; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 379-387, 2000.

HARAYAMA, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. **Environmental Biotechnology**. v. 8, p. 268-273, 1997.

HITSATSUKA, K.; NAKAHARA, T.; SANO, N.; YAMADA, K. Formation of a rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 35, p. 686-692, 1971.

HUE N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, p. 669-1672, 1969.

KIM S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L - 417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 31, p. 249-253, 2000.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants : from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, p. 187-201, 2002.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. **Biochemistry and Biotechnology**. v. 21, p. 45, 1987.

LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 66, p.109-120, 1996.

LUNA , J. M. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. Recife. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 65f.

MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 2, p. 371-376, 1999.

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, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Biosurfactante from marine microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 27 , n. 06, p. 1263-1272, 2005.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin J. Sci Technol**. v. 27, n. 3, p. 675-683, 2005.

MARÇAL, M. do C.R. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê)**. Recife, 1991. Dissertação (Mestrado em Nutrição): Universidade Federal de Pernambuco, 1991. 147f.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 54, p. 625-633, 2000.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agro industrial by products for biosurfactant production. **Journal of American Oil and Chemistry Society**. v. 71, p. 61-64, 1994.

MULLIGAN, C. N.; YONG R.N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. v. 60, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications of biosurfactants. **Environmental Pollution**. v.133, p.183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B. F. **Factoris influencing the economics of biosurfactants**. In: Kosaric, N. ed. Biosurfactants : Production, Properties, Applications. Marcel Dekker, New York , p. 329-371. 1993.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 822-832, 2001.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biolechnology**. v. 47, p. 23-29, 1990.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA D. A.; RAMKRISHNA, S.E.N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, n. 1-2, 2004 .

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biosurfactant production by *B. subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 112, p. 163-172, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL C. R.; MITCHEL D. A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochem** . v. 35, p. 1153 – 1169, 2000.

PERSSON, A ., MOLIN, G., ANDERSSON, N.& SJOHOLM, J. Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* studied in a microcomputer controlled multifermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 36, p. 252-255, 1999.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2006.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, n. 4, p. 1-10, 2003

RAHMAM, K. S.; RAHMAN, T. J. ; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R. ; BANAT, I. M. ; Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, **Biotechnology Program**. v. 18, p. 1277- 1281, 2002.

REDDY, C. A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Environmental Biotechnology**. v. 6, p. 320-328, 1995.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPINY, M. J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**. v. 11, p. 871-874, 1989.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Z. Naturforsch.** v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG, E. Microbial surfactants. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 3, n. 2, p. 109-132, 1986.

RUFINO, R. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006, 95f.

SARUBBO L.A.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 95, p.59-67, 2001.

SARUBBO L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 1-4, 1999.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 400-406, 2006.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**. v. 54, p. 68-73 , 2007.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**. v. 52, p. 353-360, 1995.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application Aspects. Biotechnol.** v. 25, p. 99-121, 2007.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant Production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch.** v. 57, p.356 – 36, 2002.

UBEDA, B. T. **Estudo do da produção de Biossurfactante pela bactéria *Kocuria riphozila***. Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA). UNICAMP, 2004. 98f.

VANCE-HARROP, M. H. **Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção e bioissorção do pireno (derivado do petróleo)**. Recife, 2004. Tese (Doutorado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 138f.

VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 120-123, 2003.

VANCE-HARROP, M. H. **Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes**. Recife, 2000. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco, 2000, 100f.

VOLLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surfaceactive di-, tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *T. sukamurella* spec. **Fett/LIPID**. v. 101, p. 389 – 394, 1999.

WEI, Y-H.; WANG, L.; CHANG, J-S.; KUNG, S-S. Identification of Incuced Acidification in Iron – Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. Universidade de Yuan Ze, 2003.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**. v. 15, p. 477-482, 1993.

ZHOU, Q-H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to product biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal or the American Oil Chemists Society**. v. 72, p. 67-71, 1995.

CAPÍTULO 2

Utilização de dois resíduos agroindustriais para a produção de surfactante por *Candida sphaerica* UCP0995

H.B.S. Sobrinho^{a,b},

R.D. Rufino^{b,c}, J.M. Luna^{b,d}, A.A. Salgueiro^{b,e}, G.M. Campos-Takaki^{b,e},

L.A. Sarubbo^{b,e}

^a*Programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil*

^b*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, n.42, Bl J, Térreo, Boa Vista Cep: 50050-590, Recife-PE, Brasil*

^c*Programa de Doutorado em Micologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil*

^d*Programa de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil*

^e*Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil*

*Autor para correspondência: Tel.: +55-81-21194017; fax: +55-81-21194043.

E-mail: leonie@unicap.br

2.1 Resumo

A produção de biossurfactantes é influenciada não só pela fonte de carbono, como também pelos demais constituintes do meio de cultivo. Neste trabalho, um meio de baixo custo foi proposto para a produção de um biossurfactante pela levedura *Candida sphaerica*. O meio foi formulado à base de água destilada suplementada com o resíduo da refinaria de óleo de soja (5%) e milhocina (2,5%) como substratos. Os dois sub-produtos utilizados constituíram não só as fontes de carbono e nitrogênio, como também de elementos minerais para propiciar o crescimento do microrganismo e a produção do biossurfactante. O rendimento em biossurfactante isolado foi de 4,5 g l⁻¹. O biossurfactante demonstrou excelente capacidade de redução da tensão superficial (26 mN m⁻¹), baixo valor de CMC (0,08 %), estabilidade térmica e estabilidade a diferentes pHs relacionadas à capacidade de redução da tensão superficial e à atividade de emulsificação de óleo motor, além de tolerância sob condições salinas. O biossurfactante foi caracterizado como um glicolípido composto por 75 % de lipídeos e 25 % de carboidratos e de natureza aniônica. O potencial de aplicação do biossurfactante na remoção de óleo de motor foi demonstrado pelo percentual de remoção (65 %). Os resultados promissores obtidos nesse trabalho indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes potentes a partir de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Biossurfactantes; Sub-produtos; *Candida sphaerica*; Resíduos industriais; Tensão superficial; Emulsificação

2.2 Abstract

Medium constituents other than carbon sources affect the production of biosurfactants. In this work we described a low cost medium for the production of a surfactant by the yeast *Candida sphaerica*. The medium was formulated only with distilled water supplemented with ground-nut oil refinery residue (5%) plus corn steep liquor (2.5%) as substrates. The two by-products utilized provided not only sources of carbon, but also mineral elements for growth stimulation and biosurfactant production. The isolated biosurfactant corresponds to a yield of 4.5 g l⁻¹. The biosurfactant showed high surface tension reducing activity (26 mNm⁻¹), a small CMC value (0.08 %), thermal and pH stability with respect to surface tension reducing activity and to emulsification activity against motor oil and a high level of salt tolerance. The biosurfactant is an anionic glycolipid, consisting of 75 % lipid and 25 % carbohydrate. The potential application of the biosurfactant in oil recovery from sand was demonstrated by the percentile of oil removal (65 %). The promising results obtained in this work are noteworthy for possible biosurfactant production from agricultural materials.

Keywords: Biosurfactants; By-products; *Candida sphaerica* ; Industrial residues; Surface tension; Emulsification

2.3 Introdução

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que se acumulam nas interfaces, reduzindo a tensão interfacial e formando estruturas de agregados chamados de micelas (Singh et al., 2007). Em função dessa propriedade, os surfactantes encontram aplicações na remediação de poluentes, na recuperação de petróleo e na formulação de lubrificantes, além de diferentes utilizações nas indústrias têxtil, cosmética, alimentícia e farmacêutica (Van Hamme et al., 2006).

A grande maioria dos surfactantes disponível é sintetizada a partir derivados de petróleo. Entretanto, nas últimas décadas, os compostos surfactantes de origem microbológica, os chamados biossurfactantes, têm despertado grande interesse comercial (Ron e Rosenberg, 2001). Uma grande variedade de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de produzir diversos produtos com excelentes propriedades superficiais (Maneerat, 2005). A maioria dos biossurfactantes compreende moléculas complexas, formadas por diferentes estruturas que incluem peptídeos, glicolipídeos, glicopeptídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos, como revisado recentemente pela literatura (Van Hamme et al., 2006). Os biossurfactantes possuem muitas vantagens frente aos surfactantes sintéticos, como natureza biodegradável, baixa toxicidade, efetividade em condições extremas de temperatura ou pH, maior compatibilidade ambiental e diversidade de aplicações (Christofi e Ivshina, 2002). Apesar das inúmeras vantagens, entretanto, os biossurfactantes ainda não são competitivos, sob o ponto de vista comercial, com os similares sintéticos (Mercade e Manresa, 1994). A utilização industrial desses compostos irá depender da redução dos custos de produção, da utilização de métodos eficientes de recuperação e da utilização de substratos de baixo custo, como indicado por Copper (1987). Diferentes estratégias devem ser desenvolvidas visando à redução dos custos, tais como a obtenção de altos rendimentos e acúmulo em produto, processos de

engenharia econômicos e uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis (Makkar e Cameotra, 2002; Deleu e Paquot, 2004; Gallert e Winter, 2002). Uma possível alternativa para a produção de biossurfactantes seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. Atualmente, o aproveitamento de resíduos vem sendo incentivado por contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados (Mukherjee et al., 2006).

Este trabalho tem por objetivo demonstrar que a co-utilização dos resíduos industriais de refinaria de óleo vegetal de soja e milhocina constitui uma alternativa vantajosa para a produção de um biossurfactante com potencial de aplicação industrial e ambiental.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Microrganismo

A *Candida sphaerica* (UCP 995), levedura isolada de sedimento de mangue, coletada no Município de Rio Formoso, Estado de Pernambuco-Brasil (Gomes et al., 2000) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como microrganismo produtor do biossurfactante. A cultura foi mantida a 5°C no meio Yeast Mold Agar (YMA).

2.4.2 Reagentes e Substratos

Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico. Os meios de cultivo foram obtidos da Difco, USA. O n-Hexadecano foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Dois resíduos industriais foram utilizados como substratos para a produção do biossurfactante. Um resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal de soja, gentilmente cedido pela ASA LTDA, Recife-PE, foi utilizado como substrato insolúvel, enquanto que a milhocina, subproduto da fabricação do milho, gentilmente cedida pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, foi utilizada como substrato solúvel.

O resíduo de refinaria de óleo de soja constituiu a principal fonte de carbono, enquanto que a milhocina constituiu a fonte de nitrogênio. Ambos os resíduos também contribuíram para o fornecimento de outros nutrientes importantes para o metabolismo do microrganismo. A composição do resíduo de refinaria está ilustrada na Tabela 1. A milhocina possui entre 21 a 45 % de proteínas, 20 a 26 % de ácido láctico, cerca de 8 % de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , etc.), cerca de 3 % de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9-1,2 %), de acordo com a literatura (Cardinal e Hedrick, 1947; Akhtar et al., 1997).

2.4.3 Meios de cultura

O meio utilizado para a manutenção da levedura foi o Yeast Mold Agar (YMA) com a seguinte composição: extrato de levedura (0,3 %), extrato de malte (0,3 %), D-glicose (1,0 %), triptona (0,5 %), ágar (5,0 %) e água destilada q.s.p. (100ml). Os componentes foram solubilizados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento do inóculo, Yeast Mold Broth (YMB). Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

A produção do biossurfactante foi realizada em água destilada suplementada com os resíduos industriais. Três combinações foram inicialmente testadas: (a) 2,5 % do resíduo e 2,5 % da milhocina em água destilada; (b) 5,0 % do resíduo e 2,5 % da milhocina em água destilada; (c) 5,0 % da milhocina e 2,5 % do resíduo em água destilada. Os meios foram

autoclavados a 121°C por 20 minutos, sendo o pH final ajustado para 5,3 com uma solução 6,0 M de HCl .

2.4.4 Preparação do inóculo

O inóculo foi padronizado transferindo-se a amostra da levedura para tubos de ensaio contendo o meio YMA. Após crescimento por 72 horas a 28 °C, as culturas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 50 ml do meio YMB, os quais foram incubados sob agitação orbital de 150 rpm a 28 °C, durante 24 horas.

2.4.5 Produção do biossurfactante

As fermentações para a produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer com 500 ml de capacidade contendo 100 ml do meio de produção incubados com 1 % da suspensão celular contendo 10^4 células ml^{-1} . Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 27 °C em mesa agitadora orbital New Brunswick modelo C-24. Amostras foram coletadas a cada 4 horas, durante as primeiras 12 horas de cultivo e, após este período, a cada 24 horas, até o fim da fermentação, sendo utilizadas para as seguintes determinações: biomassa, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante. As análises foram realizadas em triplicata e não variaram mais do que 5 %.

2.4.6 Determinação da biomassa

O crescimento foi acompanhado através da determinação da biomassa por peso seco. As amostras (10 ml) foram centrifugadas a 2 000 g durante 20 minutos, sendo a

biomassa lavada com água destilada em tubo de centrífuga graduado. Após agitação e nova centrifugação, a fase superior foi descartada e o "pellet" celular, seco em estufa a 105 °C por 24 horas e pesado.

2.4.7. Determinação de proteínas

As concentrações de proteínas nos líquidos metabólicos livre de células foram avaliadas utilizando o kit de Proteínas Totais da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, para dosagem colorimétrica de proteínas totais, pelo reativo de Biureto. O reagente de Biureto é composto por sulfato de cobre em meio alcalino e a coloração violeta formada é proporcional às ligações peptídicas. Foram pipetados 2,5 ml do reativo para 50 µl de cada amostra na presença de 2 gotas de hidróxido de sódio. A absorbância foi avaliada a 550 nm e os resultados determinados utilizando uma solução padrão de albumina bovina.

2.4.8. Determinação enzimática de lipases

A análise qualitativa de lipases foi realizada pela técnica de difusão em ágar, na presença de Tween - 20 como substrato em meio de cultura, distribuído em placas de Petri. O meio de detecção da atividade enzimática continha por litro: 8,0 g de peptona, 4,0 g de NaCl, 0,08 g de CaCl₂.2H₂O e 12,0 g de agar, sendo esterilizado a 121 °C por 20 min. Antes da distribuição do meio de cultura em placas de Petri, foi adicionado 1% de Tween - 20, o qual foi esterilizado separadamente.

Foram inoculados 10 µl do líquido metabólico livre de células ao meio de cultura em placas de Petri. As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C por 24 horas e a 4 °C durante 12 horas para facilitar a visualização do precipitado branco de sais de cálcio na presença de lipases. Essas enzimas hidrolisam o Tween - 20 com produção de ácido láurico que se precipita com formação de partículas esbranquiçadas de sais de cálcio (Hankin e

Anagnostakis, 1975). Foram testadas em triplicatas, as 27 amostras de líquido metabólico de *C. sphaerica*, originadas de três séries de fermentações. Uma lipase comercial de *Candida* foi utilizada como amostra controle.

A Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que cataliza 1 μmol de paranitrofenilpalmitato (pNPP) por minuto a pH 8,0 e 30 °C. A hidrólise do pNPP por ação de lipases produz o ácido palmítico e um derivado do paranitrofenil de coloração amarela. Conseqüentemente, a atividade lipolítica foi quantificada espectrofotometricamente, avaliando a coloração formada por unidade de tempo sob condições ótimas de pH e de temperatura.

O pNPP foi dissolvido em isopropanol e a emulsão de ensaio foi preparada na presença de triton X-100 e goma arábica dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0. No sistema de reação, foram utilizados 2,7 ml da micro-emulsão e 0,3 ml da amostra. No branco da reação, foram utilizados 0,3 ml do tampão, substituindo a amostra. As velocidades máximas das reações enzimáticas foram calculadas em função das leituras de absorbâncias medidas em 410 nm. As atividades lipolíticas internacionais foram calculadas pelo coeficiente de absorção molar do pNPP $15 \text{ m mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Vorderwulbecke et al., 1992).

As atividades específicas das amostras de líquido metabólico de *C. sphaerica*, foram calculadas dividindo as unidades de atividades internacionais (UI l^{-1}) pelas concentrações de proteínas (g l^{-1}). Uma solução a 1 % de lipase comercial de *Candida* foi diluída e utilizada como amostra controle.

2.4.9 Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 2 000 g durante 20 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta

por Cooper e Goldenberg (1987) onde 1,0 ml de um hidrocarboneto (óleo de motor, óleo de milho, óleo de algodão, benzeno, n-hexadecano ou querosene) foi adicionado a 1,0 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos graduados e agitados em vortex durante um minuto. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas e o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeito do pH, da adição de NaCl e da temperatura)

Os efeitos de diferentes temperaturas (5 °C, 70 °C, 100 °C e 120 °C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 %) e de diferentes pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0) na atividade do biossurfactante foram avaliados no líquido metabólico livre de células após centrifugação a 2000 g durante 20 minutos para determinação da estabilidade da atividade surfactante e da atividade de emulsificação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.11 Isolamento do biossurfactante

Após 144 horas de cultivo da *C. sphaerica*, o líquido metabólico foi centrifugado a 2000 g durante 20 minutos para retirada das células e submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso durante 24 horas a -15°C, as amostras foram centrifugadas a 4 000 g por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37 °C por 48 horas, até secagem, e mantidas em dessecador até peso constante, sendo o

rendimento em produto isolado, calculado em g l^{-1} . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.12 Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial foi medida no líquido metabólico livre de células após centrifugação a 2 000 g em tensiômetro automático (Sigma 70, KSV Ltd., Finlândia) utilizando-se o anel de NUOY.

A CMC do biossurfactante isolado após 144 horas de cultivo foi determinada por medidas das tensões superficiais de amostras diluídas do surfactante isolado até se atingir um valor constante de tensão. O valor da CMC foi determinado como g l^{-1} do biossurfactante isolado.

A estabilização do equipamento foi atingida até que o desvio padrão de medidas sucessivas fosse menor do que $0,4 \text{ mNm}^{-1}$. Cada resultado foi a média de dez determinações após a estabilização da leitura.

2.4.13 Caracterização do biossurfactante

Após isolamento, o biossurfactante foi submetido à determinação de carboidratos, lipídeos e proteínas.

O conteúdo em carboidratos foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois et al., (1956). Os lipídeos foram determinados de acordo com Manocha et al., (1980), onde 0,5 g do material isolado foi extraído com clorofórmio-metanol em diferentes proporções (1:1, 2:1 e 1:2 v/v). Os extratos orgânicos foram então evaporados sob vácuo e o conteúdo em lipídeos determinado por gravimetria. O conteúdo em proteínas

foi estimado pelo uso do Kit de Proteínas Totais da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, como descrito no item 2.4.7.

2.4.14 Cromatografia de camada delgada

Placas de sílica gel 60 (Merck) foram utilizadas através da aplicação de amostras do biossurfactante isolado. Como sistema, utilizou-se a mistura clorofórmio/metanol (90:10 v/v). A visualização foi feita com vapores de iodo, para identificação de constituintes lipídicos, luz ultravioleta, para identificação de carboidratos e ninhidrina, para visualização de compostos nitrogenados.

2.4.15 Potencial para biorremediação

A capacidade de remoção de óleo de motor de areia contaminada foi testada através da saturação de 60,0 g de areia de praia com 5 ml de óleo. Porções de 20,0 g da areia contaminada foram colocadas em Erlenmeyers de 250 ml, adicionando-se 20 ml de água (controle), 20 ml do líquido metabólico livre de células e 20 ml de solução aquosa do biossurfactante isolado nas seguintes concentrações: 0,05 % (abaixo da CMC), 0,08% (na CMC) e 0,1 % (acima da CMC). Os frascos foram agitados a 150 rpm por 24 horas, a temperatura ambiente e então centrifugados a 2 000 g por 20 minutos para separação da solução de lavagem da areia. O percentual de óleo remanescente na areia lavada foi determinado por gravimetria após extração com hexano (Luna et al., 2007).

2.4.16 Determinação da carga iônica do biossurfactante

A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de difusão dupla em Agar modificada (Meylheuc et al., 2001). Duas fileiras regularmente espaçadas de poços foram feitas em ágar de baixa viscosidade (solução a 1 %). Os poços das fileiras inferiores foram preenchidos com a solução do surfactante isolado. Cada poço da fileira superior foi preenchido com um composto puro de carga iônica conhecida. A substância aniônica selecionada foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M, enquanto que a substância catiônica foi o cloreto de bário, na concentração de 0,05 M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas a temperatura ambiente.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Seleção da melhor condição de produção do biossurfactante

Os dois resíduos industriais utilizados nesse trabalho forneceram não apenas a fonte de carbono e nitrogênio, mas também elementos minerais para estimular o crescimento e a produção do biossurfactante. Nesse sentido, a *C. sphaerica* foi inicialmente cultivada em água destilada suplementada com o resíduo de destilaria de óleo vegetal de soja e milhocina, como substratos, durante 144 horas. Os resultados obtidos demonstraram que a redução da tensão superficial foi similar nas três condições de cultivo estudadas, embora o melhor rendimento em biossurfactante isolado ($4,5 \text{ g l}^{-1}$) tenha sido obtido para o cultivo em meio contendo 5,0 % do resíduo oleoso e 2,5 % de milhocina (Tabela 2). Observou-se também que a milhocina favoreceu o acúmulo de biomassa em relação ao resíduo de

refinaria, provavelmente em função da maior disponibilidade de seus nutrientes para o crescimento celular.

Estudos realizados com *C. lipolytica* cultivada meio mineral contendo um resíduo de refinaria de óleo vegetal semelhante ao utilizado nesse trabalho também demonstraram um rendimento de 4,5 g l⁻¹ após 144 horas de cultivo, com redução da tensão superficial do meio para 32 mN m⁻¹ (Rufino et al., 2007).

Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Resíduos de destilaria (Babu et al., 1996; Dubey; Juwarkar, 2001), soro de queijo (Koch et al., 1988), melação (Patel, Desai, 1997) e efluente de óleo de oliva (Mercadè et al., 1993), entre outros, têm sido descritos como substratos para a produção de biossurfactantes.

Considerando a utilização de óleos vegetais de padrão alimentar, óleos vegetais residuais de fritura ou resíduos industriais oleosos, usados isoladamente ou combinados com substratos solúveis, resultados promissores têm sido obtidos na última década para a produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* (Sarubbo et al., 1997; 1999; 2001; 2006; 2007; Rufino et al., 2007). É importante considerar, entretanto, que os substratos atuam de maneira específica para cada microrganismo testado, como descrito por Haba et al. (2000), observaram que o óleo de oliva residual não foi apropriado para o crescimento celular, embora a tensão superficial do meio tenha sido reduzida nos cultivos com *Candida* sp. 39A2 (35 mN m⁻¹), *C. albicans* (39 mN m⁻¹), *C. rugosa* IFO0750 (39 mN m⁻¹) e *C. tropicalis* CECT 1357 (35 mN m⁻¹). Para o cultivo no óleo de oliva residual, especificamente, os autores observaram que a *C. lipolytica* (43 mN m⁻¹) e *C. torulopsis* (45 mN m⁻¹) não foram considerados bons produtores de biossurfactantes. O óleo de girassol, entretanto, permitiu o crescimento celular e a redução da tensão superficial na seguinte ordem: *Candida* sp. 39A2 (35 mN m⁻¹), *C. rugosa* IFO0750 (39 mN m⁻¹), *C. lipolytica* e *C. torulopsis* (40 mN m⁻¹).

2.5.2 Cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante selecionado

A Figura 1 mostra a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante de *C. sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina.

A cinética de crescimento do microrganismo demonstrou um perfil diáuxico entre 12 e 24 horas, refletindo-se na curva de pH, na redução da tensão e na produção do biossurfactante. A tensão superficial do meio diminuiu nas primeiras 12 horas de cultivo, atingindo valores em torno de 26 mN m^{-1} a partir das 24 horas, que permaneceram inalterados até o final das 144 horas. O acúmulo em biossurfactante teve início na fase exponencial, acompanhando a redução da tensão superficial e atingindo valores máximos na fase estacionária de crescimento, demonstrando uma produção associada ao crescimento, que se prolongou durante a fase estacionária. O pH do meio aumentou nas primeiras horas de crescimento exponencial, atingindo valores em torno de 7 a partir das 24 horas de crescimento da levedura e permaneceu inalterado até o fim do cultivo.

Estudos mostram que a acidez do meio é um parâmetro relacionado com a reduzida síntese de biossurfactantes, como demonstrado para o biopolímero de *Candida antarctica* ATTCM 20509 cultivada em resíduo de refinaria de óleo (Bednarski et al., 2004). Considerando que o pH não foi controlado ao longo da fermentação e que este sofreu apenas leves alterações a partir das 24 horas de cultivo, é possível que este comportamento contribua para a obtenção de maiores rendimentos em biossurfactante, como observado por Rufino (2006) quando *Candida lipolytica* UCP 0988 foi cultivada em resíduo industrial de óleo de soja.

Segundo a literatura, os biossurfactantes bacterianos são mais eficazes na redução da tensão superficial. Em especial, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem sido o microrganismo mais estudado para a produção de biossurfactantes potentes. A maioria dos biossurfactantes produzidos por essa bactéria tem demonstrado capacidade de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 28-27 mN m⁻¹ (Lang e Wullbrandt, 1999; Santa Anna et al., 2001; Gautam e Tyagi, 2006). Embora os biossurfactantes produzidos de leveduras descritos na literatura nas décadas passadas tenham demonstrado capacidade de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 35 mN m⁻¹ (Kitamoto et al., 2002) pesquisas recentes têm revelado valores compatíveis com os biossurfactantes bacterianos, como o resultado obtido nesse trabalho para o biossurfactante de *Candida sphaerica*. Recentemente, Rufino (2006) observou que o biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 cultivada em resíduo industrial de óleo de soja como substrato reduziu a tensão superficial do meio para 26 mN m⁻¹ nas 72 horas de cultivo, enquanto que Luna et al. (2007), utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção do biopolímero de *Candida glabrata*, observaram uma redução de tensão superficial para 31 mN m⁻¹ após 144 horas de cultivo.

2.5.3 Produção de lipases

A Tabela 3 apresenta os resultados de proteínas totais determinados nos experimentos realizados de *C. sphaerica* durante as 144 horas de cultivo na presença de 5 % do resíduo de refinaria de óleo de soja e 2,5 % de milhocina. Analisando os valores médios determinados, ficou evidenciada a produção máxima de proteínas totais com 72 horas de cultivo submerso, atingindo aproximadamente 23 g l⁻¹. A concentração de proteína diminuiu com 96 e 120 horas de cultivo, aumentando até atingir 22 g l⁻¹ no final do

experimento. O aumento da concentração de proteínas com 144 horas de cultivo foi devido à lise das células de leveduras na fase de morte celular (Felix et al., 2004).

No teste qualitativo de atividade lipolítica na presença de Tween-20 como substrato, os halos de sais de cálcio nas placas de Petri foram observados apenas com as amostras de líquido metabólico a partir de 72 horas de cultivo. Não foi evidenciada diferença significativa no tamanho dos halos formados pelas diferentes amostras de líquido metabólico de *C. sphaerica* e a quantidade de precipitado de sais de cálcio formada foi muito pequena.

A Tabela 3 também ilustra as atividades lipolíticas do líquido metabólico livre de células de *C. sphaerica* em unidades internacionais, quantificadas pela metodologia de Vorderwulbecke et al. 1992) durante as 144 horas de cultivo submerso na presença dos resíduos industriais.

Nas determinações enzimáticas, a maioria das amostras de lipases produzidas por *C. sphaerica* apresentou uma lenta velocidade nos primeiros minutos de reação. Para expressar os resultados de UI em função da velocidade máxima, foi necessário determinar a variação do produto formado por unidade de tempo após 4 minutos de reação.

Apesar da determinação de atividade enzimática por espectrofotometria ser uma técnica sensível, não foi detectada presença de lipases no início dos cultivos de *C. sphaerica* nas condições experimentais investigadas. As atividades das amostras com 4 e 8 horas de cultivo não foram detectadas em nenhuma das três séries de experimentos (Tabela 3). Considerando o crescimento celular dessa levedura nas condições de trabalho, houve produção de lipases porque a fonte de carbono, constituída pelo resíduo oleoso foi metabolizada com aumento da biomassa (Figura 1).

Analisando os valores médios de atividade enzimática detectada na produção de lipases por *C. sphaerica*, foram evidenciados dois picos de atividade com 12 e 72 horas de cultivo. A diminuição da atividade lipolítica com 24 horas de cultivo pode ser devido à redução de pH nas condições de trabalho, à ação de proteases produzidas pela levedura,

ou à substituição de nutrientes, utilizados como fonte de energia e carbono, conforme observado no perfil diáuxico na curva de crescimento de *C. sphaerica* (Figura 1).

Utilizando o mesmo resíduo de refinaria de óleo vegetal como fonte de carbono e de energia, a produção de lipases por *Penicillium citrinum* apresentou atividade máxima com 25 e 120 horas de cultivo submerso em frascos de Erlenmeyer. Considerando não ter sido detectado presença de proteases nas condições de trabalho, a diminuição da atividade foi justificada pela falta de estabilidade da molécula da enzima na fase estacionária do cultivo (Miranda et al., 1999; Pimentel et al., 1997).

A atividade máxima de lipases com 12 horas de cultivo produzida por *C. sphaerica* nesse trabalho foi associada ao crescimento microbiano. O valor médio de atividade lipolítica 22 UI l^{-1} foi detectado na fase exponencial de crescimento de *C. sphaerica*, conforme pode ser visualizado na curva de crescimento na Figura 1. Resultados semelhantes foram determinados por Rodriguez et al. (2006) com a produção máxima de lipases com 12 horas de cultivo de *Rhizopus homothallicus* em fermentação estacionária na presença de bagaço de cana-de-açúcar. Puthli et al. (2006) também evidenciaram a produção de lipases associada ao crescimento celular de *Candida rugosa* quando cultivada em reator sob aeração de $50,34 \text{ cc s}^{-1}$ e agitação de 600 rpm.

No início da fase estacionária de crescimento de *C. sphaerica*, um outro pico de atividade foi detectado, cujos valores atingiram 23 UI l^{-1} com 72 horas de cultivo (Tabela 3). Essa atividade lipolítica metabolizou o resíduo oleoso favorecendo a produção máxima do biossurfactante considerando que o crescimento da levedura estava na fase estacionária (Figura 1).

Os microrganismos que produzem lipase utilizando como substrato lipídeos, também são grandes produtores de emulsificantes ou biossurfactantes. Durante o metabolismo microbiano, esses compostos viabilizam a assimilação de substâncias que são pouco miscíveis na água pelos microrganismos. Foi evidenciada a produção extracelular de um glicolípido com propriedades emulsificantes por *Penicillium citrinum*, produtor de lipase

(Miranda et al., 1999), utilizando óleo de oliva como fonte de carbono na presença de sais minerais (Camargo-De-Morais et al., 2003), corroborando os resultados obtidos nesse trabalho.

A produção de lipases em resíduo contendo alto teor de lipídeos apresenta um potencial biotecnológico. Os problemas causados por óleos e graxas que diminuem a eficiência dos tratamentos de resíduos por reduzirem a transferência de massa, podem ser solucionados pela utilização de hidrolases que degradam a matéria lipídica contida nesses resíduos. O custo elevado de lipases inviabiliza a aquisição dessas enzimas para serem aplicadas em tratamento de efluente industrial. Logo, a produção de lipases em resíduo contendo lipídeos é uma alternativa promissora para aplicação dessas enzimas no tratamento industrial de resíduos contendo elevado teor de óleos e graxas (Cammarota e Freire, 2006).

Os valores de atividade específica lipolítica de *C. sphaerica* estão ilustrados na Tabela 3. Com 144 horas de cultivo, a atividade atingiu o valor mínimo ($0,7 \text{ UI g}^{-1}$), considerando a concentração de proteínas totais na fase final do experimento. A atividade específica de *C. sphaerica* atingiu o valor máximo de $5,2 \text{ UI g}^{-1}$ de proteínas com 12 horas de cultivo cuja produtividade foi $0,43 \text{ UI g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Resultados similares foram obtidos por Gutarra et al. (2007) que produziram lipase de *Penicillium simplicissimum* utilizando resíduo da produção de óleo de babaçu em fermentação no estado sólido cuja produtividade atingiu $0,45 - 0,63 \text{ UI g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

2.5.4 Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação

A redução da tensão superficial ou interfacial é considerada o principal parâmetro para detecção de um composto tensoativo em um determinado meio (Deleu e Paquot, 2004).

Em adição à tensão superficial e/ou interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a habilidade de uma molécula em formar uma emulsão estável não esteja sempre associada à redução da tensão superficial (Youssef et al., 2004).

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida encontra-se dispersa como gotas microscópicas em uma outra fase líquida contínua (Desai e Banat, 1997). Quando um líquido é disperso em outro, as pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência. A estabilidade de uma emulsão está relacionada, assim, ao comportamento do equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada pela ação deste último (Urum e Pekdemir, 2004).

A maioria dos surfactantes microbianos é específica para determinados substratos, solubilizando ou emulsificando diferentes hidrocarbonetos em proporções variáveis (Ilori e Amund, 2001). A capacidade reduzida ou até mesmo a total incapacidade de emulsificar alguns hidrocarbonetos pode ser devido à incapacidade de estabilizar as gotículas microscópicas.

Vários microrganismos degradadores de óleos produzem substâncias tensoativas e alguns produzem emulsões óleo-água estáveis. Esses microrganismos podem ser divididos em duas categorias; a que produz surfactantes de baixa massa molar e, usualmente, não produzem emulsões estáveis, e a que produz polímeros que agem, inicialmente, como estabilizadores de emulsões, embora não sejam capazes de alterar a tensão superficial. Em alguns casos, poucas bactérias e leveduras possuem ambas propriedades (Bredhold et al., 1998; Sarubbo et al., 2006). Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a *C. sphaerica*

possa ser incluída na última categoria de microrganismos, uma vez que a levedura foi capaz não só de reduzir a tensão superficial, como também de produzir emulsões estáveis com óleo de motor, como descrito a seguir. As emulsões formadas permaneceram estáveis por mais de uma semana. Entretanto, considerando a especificidade da maioria dos biossurfactantes para um determinado substrato, mais pesquisas são necessárias para confirmar esses resultados.

Fatores ambientais como pH, salinidade e temperatura também influenciam a atividade e a estabilidade de um biossurfactante. Conseqüentemente, torna-se de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (Mulligan, 2005).

Inicialmente, a resistência do biossurfactante à adição de NaCl foi investigada. O biossurfactante de *C. sphaerica* manteve a capacidade de redução da tensão superficial até a concentração de 10 % de NaCl (Tabela 4). A atividade de emulsificação do óleo de motor também permaneceu praticamente inalterada ao longo da adição do sal. A estabilidade demonstrada pelo biossurfactante de *C. sphaerica* sob condições elevadas de salinidade sugerem a aplicação em ambientes marinhos e em indústrias relacionadas à emulsificação. O emulsificante produzido por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 cultivada em n-hexadecano resistiu a adição de NaCl até 8 % (Zinjarde et al., 1997), enquanto que o emulsificante de *C. tropicalis* foi capaz de tolerar até 5 % de NaCl, embora tenha perdido 20 % de sua atividade quando submetido à 10 % do sal (Singh e Desai, 1989). Pesquisas recentes sobre a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica* (Sarubbo et al., 2007; Rufino et al., 2007) e por *C. glabrata* (Sarubbo et al., 2006) demonstraram a estabilidade dos agentes tensoativos na presença de NaCl. Resultados promissores relacionados à estabilidade sob condições salinas também têm sido demonstrados para outros surfactantes produzidos por bactérias (Ilori et al., 2005; Kim et al., 2000; Luna-Velasco et al., 2007; Navon-Venezia et al., 1995).

A estabilidade do biossurfactante de *C. sphaerica* também foi testada para diferentes temperaturas. O biossurfactante demonstrou estabilidade durante 1 hora de incubação a temperaturas variando entre 4 a 120 °C (Tabela 5), indicando a possibilidade de uso em indústrias onde o aquecimento até temperaturas elevadas seja de importância fundamental no processo. O biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo industrial (Rufino et al., 2007) e o biossurfactante lipopeptídico de *Bacillus subtilis* C9 cultivado em glicose (Kim et al., 1997) demonstraram estabilidade térmica similar em relação à faixa de variação de temperatura testada, embora o biossurfactante de *C. lipolytica* tenha perdido significativa capacidade de emulsificação a 100 °C. Cirigliano e Carman (1984) reportaram que o emulsificante de *Candida lipolytica* permaneceu estável a 70 °C por 1 hora, perdendo 60 % da atividade a 100 °C. Recentemente, Joshi et al. (2007) verificaram a estabilidade das propriedades tensoativas dos biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus* cultivados em resíduos quando submetidos a 80 °C durante oito dias. O bioemulsificante de *Penicillium* sp. também demonstrou estabilidade a 93 °C (Luna-Velasco et al., 2007). Já o biossurfactante de *Bacillus pumilus* espécie 28-11, embora tenha formado emulsões muito estáveis com óleo bruto, teve a estabilidade diminuída pelo calor (Calvo et al., 2004).

Estudos com o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *C. sphaerica* em diferentes pHs demonstraram a estabilidade da capacidade de reduzir a tensão superficial e a manutenção de praticamente 100 % da atividade de emulsificação do óleo de motor, embora o maior percentual de atividade emulsificante tenha sido observado em pH 2,0 (Tabela 6). O emulsificante de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 cultivada em hexadecano também permaneceu estável e ativo em uma ampla faixa de pH (2,0-10,0), embora uma perda significativa tenha sido observada acima do pH 10,0 (Zinjarde et al., 1997). A eficiência do biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em óleo de canola e glicose, por outro lado, se limitou à faixa ácida-neutra de pH, embora um aumento acentuado no índice de emulsificação tenha ocorrido no pH 12,0 (Sarubbo et al., 2007). O biossurfactante

de *Bacillus licheniformis* cultivado em resíduos agroindustriais, por outro lado, demonstrou estabilidade na faixa de pH entre 7,0 e 12,0 (Rammani et al., 2005). A estabilidade da tensão superficial do líquido metabólico produzido por *Bacillus subtilis* foi determinada frente a diferentes pHs (3,0 a 11,0), observando-se, também, para essa bactéria, apenas pequenas variações, da ordem de 4 mN m^{-1} (Brown et al., 1985). Abu-Ruwaida et al. (1991) também estudaram a influência do pH na tensão superficial, demonstrando que tais variações não provocaram grandes alterações nos valores da tensão superficial do líquido metabólico produzido pelas bactérias. A tensão superficial do líquido metabólico livre de células dos biossurfactantes isolados de espécies de *Bacillus* cultivados em melão e soro de queijo também se manteve inalterada na mesma faixa de pH estudada nesse trabalho (Joshi et al., 2007).

2.5.5 Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC)

A CMC é um índice largamente utilizado para avaliar a atividade surfactante. A relação entre a tensão superficial e a concentração da solução do surfactante isolado foi determinada em tensiômetro automático (Figura 2). O biossurfactante de *C. sphaerica* exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 70 mN m^{-1} para $27,5 \text{ mN m}^{-1}$ com o aumento da concentração do biossurfactante até 0,08 %. A partir desse ponto, o aumento da concentração da solução do biossurfactante não provocou maiores reduções na tensão superficial da água, indicando que a CMC havia sido atingida nessa concentração. O biossurfactante de *C. sphaerica* demonstrou maior capacidade de reduzir a tensão do que os surfactantes de *C. lipolytica* (32 mN m^{-1}) (Rufino et al., 2007), de *C. glabrata* (31 mN m^{-1}) (Sarubbo et al., 2006), de *C. antarctica* (35 mN m^{-1}) (Adamczac e Bednarski, 2000) e de *Yarrowia lipolytica* (50 mN m^{-1}) (Amaral et al., 2006). O biossurfactante produzido nas condições estudadas nesse trabalho

também demonstrou uma CMC muito inferior do que a CMC de outros surfactantes de leveduras descritos na literatura, considerando os valores de 2,5 % encontrados para os biossurfactantes de *C. lipolytica* (Sarubbo et al., 2007) e *C. glabrata* (Luna et al., 2007) e valores de 1 % para o biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo de refinaria (Rufino et al., 2007), enquanto que a CMC do biossurfactante produzido por *C. antarctica* cultivada em resíduo industrial foi semelhante à obtida nesse trabalho (Adamczak e Bednarski, 2000).

2.5.6 Caracterização do biossurfactante

A análise bioquímica do biossurfactante isolado indicou a presença de 75 % de lipídeos e 25 % de carboidratos, revelando a natureza glicolipídica do surfactante de *Candida sphaerica*, também evidenciada pelos resultados positivos observados para lipídeos e carboidratos por cromatografia em placa.

Os testes de difusão dupla em ágar revelaram o surgimento de linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido pela *C. sphaerica* e o composto iônico selecionado (cloreto de bário) demonstrando, nas condições experimentais estudadas, o caráter aniônico do biossurfactante através da utilização de um teste bastante simples.

Diversas pesquisas desenvolvidas para a produção, o isolamento e a caracterização de surfactantes por diferentes espécies do gênero *Candida* têm sido desenvolvidas. Os biossurfactantes produzidos diferem bastante entre as diferentes espécies. Relatos sobre a produção de glicolipídeos (Desai e Desai, 1993; Garcia-Ochoa e Casas, 1999; Shepherd et al., 1995), complexos carboidratos-proteínas (Cirigliano e Carman, 1985), ácidos graxos de cadeia longa (Kapelli et al. (1978) e complexos proteínas-carboidratos-lipídeos (Sarubbo et al., 1999; 2001, 2006; 2007; Rufino et al., 2007; Zinjarde et al., 1997), produzidos a partir de substratos solúveis ou insolúveis ou da combinação de ambos, têm sido descritos.

2.5.7 Aplicação do biossurfactante na remoção de óleo adsorvido em solo

Os hidrocarbonetos derivados de petróleo adsorvem-se às partículas do solo sendo de difícil remoção e/ou degradação. Os biossurfactantes são capazes de emulsificar os hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade em água e reduzindo a tensão superficial, facilitando, assim, o desprendimento dessas substâncias oleosas das partículas do solo (Banat et al., 2000).

Os resultados obtidos para o biossurfactante isolado de *C. sphaerica* demonstraram que a solução a 0,1 % de concentração (acima da CMC) foi capaz de remover 65 % do óleo de motor adsorvido na amostra de areia testada. A solução do surfactante na CMC (0,08 %) removeu 55 % do óleo, enquanto que a solução abaixo da CMC (0,05 %) removeu cerca de 30 %. O controle, formulado com água destilada, removeu apenas 14,5 % do óleo adsorvido.

O biossurfactante de *C. antarctica* demonstrou capacidade de remover cerca de 50 % de óleo adsorvido em areia (Adamczac e Bednarski, 2000), enquanto que a solução do biossurfactante isolado de *C. glabrata* a 2,5 % de concentração removeu cerca de 84 % do óleo de motor adsorvido em areia (Luna et al., 2007). Resultados obtidos por Abu-Ruwaida et al. (1991) para o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido por *Rhodococcus* demonstraram remoções de 86 % de óleo bruto residual adsorvido em areia. Uma pesquisa mais recente com um biossurfactante também produzido por *Rhodococcus* cultivado em n-hexadecano revelou a habilidade do polímero em remover 82 % de óleo bruto contido em coluna (Kuyukina et al., 2005). Cameotra e Makkar (1998) demonstraram que o biossurfactante isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de remover 56 % do óleo adsorvido em areia contida em coluna, enquanto que os biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus* cultivados em resíduos (melaço e soro

de queijo) em condições termofílicas removeram cerca de 30 % do óleo contido em coluna (Joshi et al., 2007).

2.6 Conclusões

O glicolípido produzido pela levedura *C. sphaerica* representa um novo tipo de biossurfactante com atividade superficial altamente estável e habilidade de emulsificação a altas temperaturas, diferentes pHs e em condições salinas elevadas. O uso de resíduos agroindustriais constitui uma alternativa atrativa para a produção de biossurfactantes, uma vez que as fontes utilizadas são disponíveis e de baixo custo. O surfactante produzido possui potencial para aplicações industriais e ambientais, especialmente na indústria de petróleo, onde poderá ser utilizado na recuperação de petróleo, na limpeza de reservatórios e como coadjuvante na biorremediação de solos contaminados com poluentes hidrofóbicos.

2.7 Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pela Universidade Católica de Pernambuco, Brasil.

2.8 Referências

- Abu-Ruwaida A.S., Banat, I.M., Haditirto S., Salem A., Kadri, M., 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria - Product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnol.* 2, 315-324.
- Adamczak, M., Bednarski, W., 2000. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.* 22, 313-316.

- Akhtar, M., Lentz, M.J., Blanchette, R.A., Kirk, T.K., 1997. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. TAPPI J. 80, 161-164.
- Amaral, P.F.F., Da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem. 41, 1894-1898.
- Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A., Khanna, P., 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol. Lett. 18, 263-268.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 495-508.
- Brown, m. j., Foster, M., Moses, V., Robinson, J. P., Shales, S. W., Springham, D. G., 1985. In: Proceeding of the 3 European Meeting on Improved Oil Recovery , Rome.
- Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., Plaszczyk, M., 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. Biores. Technol. 95, 15-18.
- Bredholdt, H., Josefen, K., Vatland, A., Bruhelm, P., Eimhjellen, K., 1998. Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. Can. J. Microbiol. 44, 330-340.
- Calvo, C., Toledo, F.L., González-López, J., 2004. Surfactant activity activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. J. Biotechnol. 109, 255-262.

- Camargo-De-Morais, M.M., Ramos, S.A.F., Pimentel, M.C.B., Morais J.R.M.A., Lima-Filho, J.L. 2003. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 191-194.
- Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G., 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Biores. Technol.* 97, 2195-2210.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 520-529.
- Cardinal, E.V., Hedrick, L.R., 1947. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem.* 609-612.
- Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915-929.
- Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
- Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 846-850.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224-229.
- Deleu, M., Paquot, M., 2004. From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 7, 641-646.

Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Rev.* 61, 47-64.

Desai, J.D., Desai, A., 1993. Biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactants: Production, Properties and Application*. Surfactant Science Series. Marcel Dekker Inc., New York, 48, pp. 65-86.

Dubey, K., Juwarkar, A., 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 61-69.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton. J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

Felix, C.R., Noronha, E.F., Marco, J.L. de., 2004. Proteases – características e aplicações industriais. In: S. Said, R.C.L.R. Pietro. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 327-347.

Gallert, C., Winter, J. 2002. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften* 89, 483-496.

Garcia-Ochoa, F., Casas, J.A., 1999. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 613-621.

Gautam, K.K., Tyagi, V.K., 2006. Microbial Surfactants: A review. *Journal of Oleo Science.* 55, 155-166.

- Gomes, P. F., Nascimento, A. E., Okada, K., Messias, A. S., Sharia, A. E. N., Campos-Takaki, G. M. 2000. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município do Rio Formoso In: Internacional Conference : Sustainable use of estuaries and mangroves: Challenges and Prospects, Anais, 28
- Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Castilho, L. R., Freire, D.M.G., 2007. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82, 313-318.
- Haba E., Espuny, M.J., Busquets, M. Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88, 379-387.
- Hankin, L., Anagnostakis, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Micologia. 67, 597-607.
- Ilori, M.O., Amund, O.O., 2001. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. Z. Naturforsch. 56C, 547-552.
- Ilori, M.O., Amobi, C.J., Odocha, A.C., 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. Chemosphere 61, 985-992.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2007. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Biores. Technol. IN PRESS.

- Kappeli, O., Muller, M., Fiechter, A., 1978. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacteriol.* 133, 952-958.
- Kim, H-S., Yoon, B-D., Lee, C-H., Suh, H-H.; Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y., 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Fermentation Bioeng.* 84, 41-46.
- Kim S-H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D., Lee, C-H., 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 249-253.
- Koch, A.K., Reiser, J., Kappeli, O., Fiechter, A., 1988. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. *Biotechnol.* 51, 1335-1339.
- Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T., 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosc. Bioeng.* 94, 187-20.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S.O., Litvinenko, L.V., Cunningham, C.J., Philip, J. C., 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environm. Int.* 31, 155-161.
- Lang, S., Wullbrandt, D., 1999. Rhaminose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 22-32.

- Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2007. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. Brazilian Arch. Biol. Technol. IN PRESS.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 428-434.
- Maneerat, S., 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27, 675-683.
- Manocha, M.S., San-Blas, G., Centeno, S., 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. J. General Microbiol. 117, 147-154.
- Mercade, M.E., Manresa, M.A., 1994. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. JAOCS 71, 61-64.
- Mercade, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, C., Guinea, J., 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Biores. Technol. 431, 1-6.
- Meylheuc, T.; Van Oss, C. J.; Bellon- Fontaine, M.N., 2001. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. J Appl Microbiol 91, 822-832.
- Miranda, O.A., Salgueiro, A.A., Pimentel, M.C.B., Lima-Filho, J.L., Melo, E.H.M., Duran, N., 1999. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using na industrial residue. Biores. Technol. 69, 145-147.

- Mukherjee S., Das P., Sen R., 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24, 509-515
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollution* 133, 183-198.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmelli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3240-3244.
- Patel, R.M., Desai, A.J., 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 91-94.
- Pimentel, M.C.B., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., Ledingham, W.M., Duran, N., 1997. Brazilian strain of *Penicillium citrinum* lipase: heat-denaturation and pH stability studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66,185-195.
- Rammani, P., Kumar, S.S., Gupta, R., 2005. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process Biochem.* 40, 3352-3359.
- Rodriguez, J.A., Mateos, J.C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J., 2006. Improving lipase production by a nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem.* 41, 2264-2269.
- Ron, M., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3, 229-236.

- Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 734-741.
- Rufino, R. D., 2006. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. Tese (Mestrado) – CCB – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- Santa Anna, I. M. , Sebastian, G. V., Pereira Jr, N. , Alves, T. L. M., Menezes, E. P. , Freire, D. M. G. , 2001. Production of biosurfactant from a new andnpronussing strain of *Pseudomonas aeruginosa* P. A. 1 . *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 91-93, 459-467 .
- Sarubbo, L.A., Marçal, M.C.R., Campos-Takaki, G.M., 1997. Comparative study of bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* strains. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 40, 707-720.
- Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Can. J. Microbiol.* 45, 423-426.
- Sarubbo, L.A., Marçal, M.C.R., Neves, M.L.C., Silva, M.P.C., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., 2001. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95, 59-67.
- Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Eletronic J. Biotechnol.* 9, 400-406.

- Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M., 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 54, 68-73.
- Shepherd, R., Rockey, J., Shutherland, I.W., Roller, S., 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* 40, 207-217.
- Singh, M., Desai, J.D., 1989. Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian J. Experimental Biol.* 27, 224-226.
- Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O. P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25, 99-121.
- Urum, K., Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere.* 57, 1139—1150.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.W., 2006. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 24, 604-620.
- Vorderwulbecke, T., Kieslich, K., 1992. Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Micro. Technol.* 14, 631-639.
- Youssef, N. H., Ducan, K. E., Nagle, D. P. , Savage, K. N., knapp, R. M. , Mcinerney, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methods.* 56, 339-347.

Zinjarde, S., Chinnathambi, S., Lachke, A.H., Pant, A., 1997. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. Lett. Appl. Microbiol. 24, 117-121.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Curvas de crescimento, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina

Fig. 2. Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo e 2,5 % de milhocina

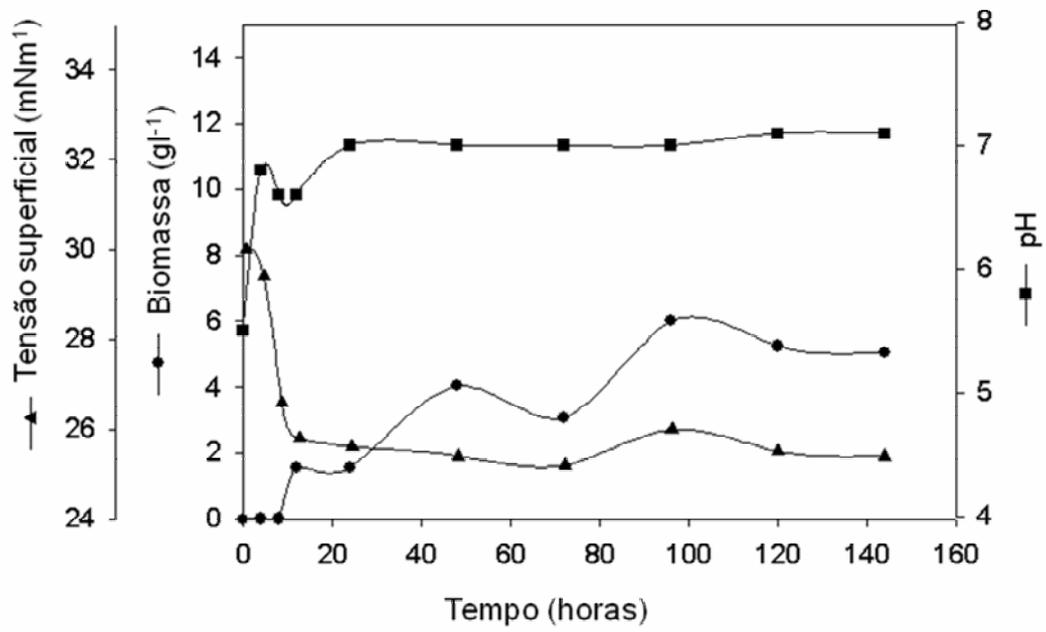


Fig. 1.

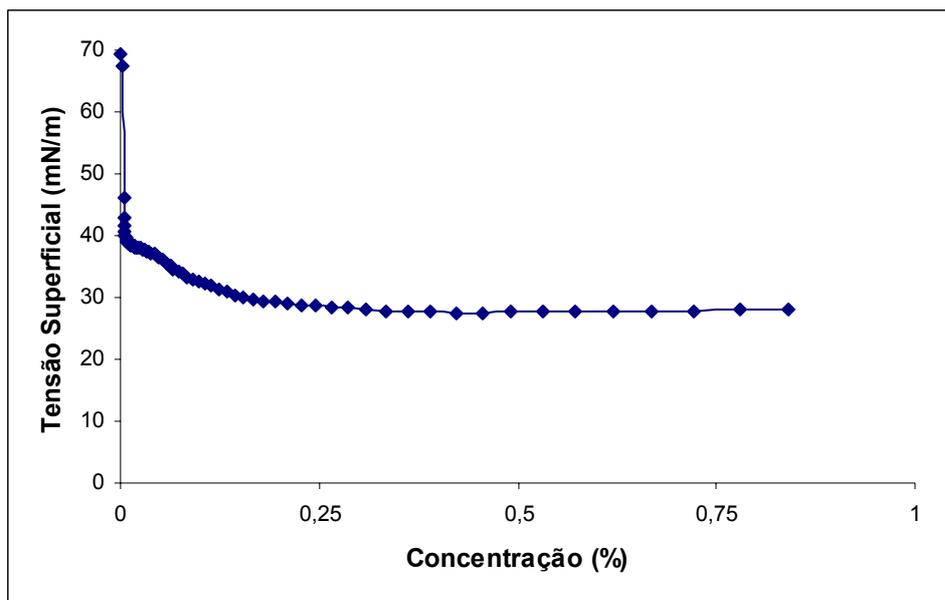


Fig. 2.

TABELAS

Tabela 1

Composição do resíduo de refinaria de óleo de soja utilizado na produção do biossurfactante por *Candida sphaerica*

Resíduo de refinaria de óleo de soja	Composição (%)
Material graxo	60,000
Carboidratos	35,000
Sódio	2,700
Magnésio	0,080
Potássio	0,063
Zinco	0,004

Tabela 2

Tensão superficial, biomassa e rendimento dos biossurfactantes produzidos por *Candida spheerica* cultivada na presença de resíduos industriais como substratos durante 144 horas

Substratos	Tensão superficial (mN m⁻¹)	Biomassa (g l⁻¹)	Rendimento em biossurfactante (g l⁻¹)
2,5 % de resíduo de refinaria de óleo de soja e 2,5 % de milhocina	27,295	3,430	1,56
2,5 % de resíduo de refinaria de óleo de soja e 5,0 % de milhocina	25,840	3,990	2,02
5,0 % de resíduo de refinaria de óleo de soja e 2,5 % de milhocina	26,360	2,264	4,51

Tabela 3

Atividade lipolítica específica do líquido metabólico livre de células de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo e 2,5 % de milhocina

Tempo (h)	Atividade internacional (UI l⁻¹)	Proteína (g l⁻¹)	Atividade específica (UI g⁻¹ proteína)
4	N.D.	4,7	N.D.
8	N.D.	1,4	N.D.
12	22	4,2	5,2
24	18	15,4	1,2
48	17	15,9	1,1
72	23	22,8	1,0
96	12	9,7	1,2
120	13	10,5	1,2
144	16	22,0	0,7

Legenda: N.D. = não detectado

Tabela 4

Influência da adição de NaCl na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina durante 144 horas

NaCl (%)	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Índice de emulsificação (%) ^a
2	26,0	40
4	27,0	40
6	26,5	37
8	26,5	35
10	28,0	36

^a Índice de emulsificação do óleo de motor

Tabela 5

Influência da temperatura na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biosurfactante de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina durante 144 horas

Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Índice de emulsificação (%) ^a
4	25,5	50
28	26,2	54
70	26,1	54
100	26,0	55
120	24,5	53

^a Índice de emulsificação do óleo de motor

Tabela 6

Influência do pH na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0 % de resíduo de refinaria e 2,5 % de milhocina durante 144 horas

pH	Tensão superficial (mN m⁻¹)	Índice de emulsificação (%)^a
2.0	29,0	60
4.0	27,4	38
6.0	26,7	35
8.0	26,0	35
10.0	26,7	36
12.0	28,5	35

^a Índice de emulsificação do óleo de motor

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados com a linhagem de *Candida sphaerica* permitem as seguintes conclusões:

- A *Candida sphaerica* UCP 995 apresenta grande potencial como microrganismo produtor de compostos com atividades surfactante e emulsificante;
- a combinação dos substratos resíduo de refinaria, rico em material graxo, e milhocina, rica em proteínas, é uma alternativa vantajosa para a formulação de um meio de baixo custo para a produção de biossurfactantes;
- a produção de lipase por *Candida sphaerica* apresenta dois picos de atividade, um na fase exponencial de crescimento e o outro, no início da fase estacionária, associada à produção máxima do biossurfactante;
- o potencial de aplicação do biossurfactante produzido como agente de superfície foi evidenciado considerando que o menor valor de tensão superficial atingido foi semelhante a valores descritos na literatura para bactérias e leveduras super produtoras de surfactantes;
- a CMC do biossurfactante produzido foi inferior às concentrações micelares descritas para surfactantes de leveduras, demonstrando a eficiência do polímero;
- o biossurfactante produzido demonstra estabilidade térmica, estabilidade frente a pHs ácidos e básicos e tolerância a elevadas concentrações de NaCl;
- o biopolímero produzido pode ser utilizado como emulsificante de óleos e gorduras, considerando o tipo de hidrocarboneto e as condições do meio de aplicação;
- o biossurfactante, como a maioria dos surfactantes produzidos por espécies de *Candida*, foi caracterizado como um glicolípideo de natureza aniônica;
- o potencial de aplicação do biossurfactante na biorremediação foi demonstrado pelos percentuais de remoção de óleo de motor adsorvido em areia contaminada.

ANEXOS

Parte dos resultados obtidos nesse trabalho foram submetidos para apresentação em eventos:

SOUZA-SOBRINHO, H.B.; GUSMÃO, C.A.B., LUNA, J.M.; RUFINO R.D.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. **Estabilidade das propriedades emulsificantes do biossurfactante de *Candida sphaerica* UCP 0995**. X-ENAMA, Goiânia, de 28 de novembro a 01 de dezembro de 2006.

SOUZA-SOBRINHO, H.B.; GUSMÃO, C.A.B., LUNA, J.M.; RUFINO R.D.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. **Estabilidade das propriedades tensoativas do biossurfactante de *Candida sphaerica* UCP 0995**. X-ENAMA, Goiânia, de 28 de novembro a 01 de dezembro de 2006.

SOUZA-SOBRINHO, H.B.; GUSMÃO, C.A.B., LUNA, J.M.; RUFINO R.D.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. **Produção de biossurfactante por *C. sphaerica* em meio de baixo custo**. 1º Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia: de mãos dadas para o futuro, Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE, de 15 de agosto a 18 de agosto de 2006.

SOUZA-SOBRINHO, H.B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R.D.; FARIAS, C.B.B. GUSMÃO, C.A.B.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. **Propriedades do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivada em resíduos industriais**. III Simpósio de Microbiologia Aplicada, Rio Claro - SP, de 19 de abril a 21 de abril de 2007.

SOUZA-SOBRINHO, H.B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R.D.; FARIAS, C.B.B.; GUSMÃO, C.A.B.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. **Vegetal oil refinery waste and corn steep liquor as viable alternative sources for biosurfactant production** – II Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology – Old and New Energy Sources, Natal – RN, de 14 de novembro a 17 de novembro de 2006.

Goiânia, de 28/11 à 01/12 de 2006

Certificado

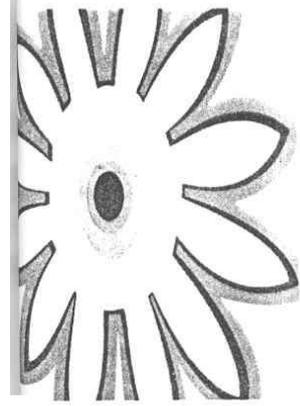
Souza-Sobrinho, H.B.; Gusmão, C.A.B.; Luna, J.M.;
Certificamos que Rufino, R.D.; Salgueiro, A.A. & Sarubbo, L.A.
participou do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental,

na qualidade de Apresentação do trabalho “Estabilidade das
Propriedades Emulsificantes do Biossurfactante de *Candida sphaerica*
UCP 0995” na forma de Pôster.

José Daniel Gonçalves Vieira
Presidente da Comissão Organizadora

Valéria Ribeiro Maitan
Secretária Geral do X ENAMA





Goiânia, de 28/11 à 01/12 de 2006

Certificado

Certificamos que **Souza-Sobrinho, H.B.; Gusmão, C.A.B.; Luna, J.M.;**
Rufino, R.D.; Salgueiro, A.A. & Sarubbo, L.A.

participou do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental,

na qualidade de **Apresentação** do trabalho **“Estabilidade das**
Propriedades Tensioativas do Biossurfactante de Candida sphaerica UCP
0995” na forma de Pôster.

José Daniel Gonçalves Vieira
Presidente da Comissão Organizadora

Valéria Ribeiro Maitan
Secretária Geral do X ENAMA





Universidade Católica de Pernambuco

Certificado

Autores do Trabalho:
HUMBERTO BEZERRA DE SOUZA SOBRINHO
Carolina Arruda Buarque de Gusmão
Juliana Moura de Luna
Raquel Diniz Rufino
Alexandra Amorim Salgueiro

Certificamos que o trabalho **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR CANDIDA SPHAERICA EM MEIO DE BAIXO CUSTO** foi apresentado em Apresentação de Paineis, durante o I Workshop - Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia, no período de 15/08/2006 a 18/08/2006, na Universidade Católica de Pernambuco - Recife - Pernambuco.

Galba Maria de Campos Takaki

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Coordenadora do NPC/IAMB

Junot Matos

Prof. Dr. Junot Cornélio Matos
Pró-Reitor de Ensino, Pesquisa e Extensão - PROESPE

Pedro Rubens

Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J.
Reitor

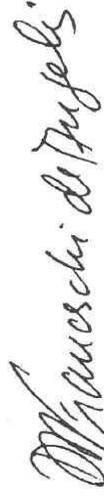
Certificado

Certificamos que o trabalho "PROPRIEDADES DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Candida sphaerica* UCP 0995 CULTIVADA EM RESÍDUOS INDUSTRIAIS" de autoria de SOBRINHO, H. B. S. S.; LUNA, J. M. L.; RUFINO, R. D. R.; FARIAS, C. B. C. F.; GUSMÃO, C. B. B. G.; SALGUEIRO, A. A. S.; SARUBBO, L. A. S foi apresentado, sob a forma de painel, no III Simpósio em Microbiologia Aplicada, realizado no período de 19 a 21 de abril de 2007, no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

Rio Claro, 21 de abril de 2007



Prof. Dr. Jonas Contiero
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
Microbiologia Aplicada



Prof. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis
Coordenadora do Simpósio



Certificamos que

Humberto Bezerra Souza Sobrinho; Carolina Arryda Buarque de Gusmão; Juliana Moura de Luna; Raquel Diniz. Rufino; Alexandra Amorim Saigueiro; Leonie Asfora Sarubbo

apresentaram o trabalho científico:

VEGETAL OIL REFINERY WASTE AND CORN STEEP LIQUOR AS VIABLE ALTERNATIVE SOURCES FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION

no SECOND BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY OLD AND NEW ENERGY SOURCES, promovido pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN e realizado pelo CROB/LBMG do DBG-CB/UFRN durante o período de 13 a 17 de Novembro de 2006.

Natal- RN, Brasil, 17 de Novembro de 2006.

DR. CARLOS A. GALINDO BLAHA
COORDENADOR DO II-BSPB



JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY



Guide for Authors

Journal of Biotechnology provides a medium for the rapid publication of both full-length articles and short communications on all aspects of biotechnology. The Journal will accept papers ranging from genetic or molecular biological aspects to those covering biochemical, chemical or bioprocess engineering aspects, provided that in each case the material is directly relevant to biotechnological systems. **Papers presenting information of a multi-disciplinary nature, that would not be suitable for publication in a journal devoted to a single discipline, are particularly welcome.** The following areas are covered by the Journal: Nucleic Acids / Molecular Biology; Physiology / Biochemistry; Biochemical Engineering / Bioprocess Engineering; Industrial Processes / New Products; Medical Biotechnology.

Submission of manuscripts

Submission of a paper to the Journal of Biotechnology implies: (1) that it is not being submitted for publication elsewhere; (2) the transfer of the copyright from the author to the Publisher.

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

Types of papers

- (1) *Full-length papers*, generally not exceeding 15 typewritten pages. Full-length papers should:
 - (a) be divided into sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion);
 - (b) contain an Abstract, not exceeding 200 words, at the beginning of the paper, followed by 3-6 keywords;
 - (c) not exceed 10-12 printed pages (approximately 15 typewritten pages) including the space required for figures. Longer papers will be considered, but may be subject to delayed publication.
- (2) *Short Communications*, not exceeding 1500 words or equivalent space including figures and tables. These must be brief definitive reports and not preliminary findings. Short communications may not be divided into Materials and Methods, Results and Discussion, instead, Materials and Methods may be described in the text or, if appropriate, in figure legends or table footnotes.
- (3) *Reviews* will be published following invitation from Review Editor or by the suggestion of authors.

(4) *Special Issues* on highlighted aspects of biotechnology are also published. Special Issues may contain selected contributions from international meetings, or a collection of papers on a specific topic, and may be composed of review articles, research papers, and short notes. Guest Editors responsible for the organisation of Special Issues will be invited by the Editors of the Journal, but may also be suggested by scientists who are willing to organize a special issue on a topic that deserves publication.

(5) *Letters to the Editor* and announcements of meetings and courses will be included at the discretion of the Editors and the Publisher.

(6) *Supplements* will be published at the discretion of the Publisher in consultation with the Chief Editor. Please contact the Publishing Editor direct for further information: Monique Lamine, Journal of Biotechnology, Elsevier, Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, E-mail: m.lamine@elsevier.com

Manuscripts

The manuscript should be typed with double spacing and wide margins, and should be accompanied by a separate title page giving the authors' names and affiliations, as well as an address for correspondence including fax number and e-mail address. If it is a resubmission this has to be indicated and the former J. Biotechnol. MS No. has to be given. All pages have to be numbered consecutively, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgement of the present manuscript should be enclosed to facilitate reviewing.

For the title, avoid numbered series titles.

In the Abstract, avoid abbreviations and references. The Abstract should be followed by up to six Keywords.

The Material and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When experimental conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure. For commonly used methods a simple reference is sufficient. If several alternative methods are described in the paper cited, please identify the method briefly in addition to the reference. Describe new methods completely.

Present the Results as concise as possible in either table(s) or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. The Results and Discussion sections may be combined.

References should be assembled on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be

identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. and year in brackets. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should follow the examples below:

Ponti, C., Sonnleitner, B. and Fiechter, A. (1995) Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 1. Operating conditions. *J. Biotechnol.* 38, 173-182. Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D. (1985) Partitioning in aqueous two-phase systems. Academic Press, Inc., Orlando, FL. Hamer, G. (1989) Fundamental aspects of aerobic thermophilic digestion. In: Bruce, A.M., Colin, F. and Newman, P.J. (Eds.), *Treatment of Sewage Sludge: Thermophilic Aerobic Digestion and Processing Requirements for Landfilling*. Elsevier Applied Science, London, pp. 2-19.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations, International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8.

Tables should be typed double-spaced on separate sheets, numbered consecutively with Arabic numerals, and only contain horizontal lines. A short descriptive title should appear above each table, with possible legend and footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Figures should be line drawings in black ink. Figures should be completely labeled, the size of the lettering being appropriate to that of the drawing, taking into account the necessary reduction in size. All legends should be typed double-spaced on separate sheets. If figures are not to be reduced their format should not exceed 16.0 x 20.2 cm. Colour reproduction is possible. Authors wishing to publish colour figures will be expected to pay for their production costs. Figure legends have to be submitted on separate sheets.

Equations have to be numbered consecutively.

Nomenclature. A list of symbols and abbreviations (e.g., of enzymes) should be provided. 'Fermentation' and 'fermenter' have become very ambiguous expressions and, therefore, should be avoided in this Journal. Preferably use other expressions such as cultivation or bioreactor, respectively. Units and Dimensions should be expressed according to IUPAC nomenclature, e.g.

Time, s, min, h, d, a; Mass, ng, mg, g, kg, t;

Length, nm, mm, cm, m, km; Volume, l, ml, ml; Dalton, Da, for molecular mass.

Molecular weight has no dimension.

Negative powers should be used instead of fractions, e.g., g l⁻¹ h⁻¹, nmol ml⁻¹, etc.

Dimensions should not be mixed with specifications, e.g., protein per biomass (g g⁻¹) instead of g protein/g biomass.

Scientific and Engineering Symbols. Growth kinetics and cultivation: As recommended by the International Commission at the 2nd Int. Symposium on Cont. Cultivation of Microorganisms, Prague 1962 (Proceedings published by Academic Press, New York, p. 379, 1962). Other symbols: as per 'Perry's Chemical Engineering Handbook'.

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

All questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to: Elsevier Ireland Ltd., Issue Manager Journal of Biotechnology, Elsevier House, Brookvale

Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, E-mail. d.cusack@elsevier.com.

Proofs will be sent to the first-named author of an article, unless an alternative is requested on the title page of the manuscript. They should be checked carefully and returned within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: no changes in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage.

Page charges will not be made.

Guide for Authors

Journal of Biotechnology provides a medium for the rapid publication of both full-length articles and short communications on all aspects of biotechnology. The Journal will accept papers ranging from genetic or molecular biological aspects to those covering biochemical, chemical or bioprocess engineering aspects, provided that in each case the material is directly relevant to biotechnological systems. **Papers presenting information of a multi-disciplinary nature, that would not be suitable for publication in a journal devoted to a single discipline, are particularly welcome.** The following areas are covered by the Journal: Nucleic Acids / Molecular Biology; Physiology / Biochemistry; Biochemical Engineering / Bioprocess Engineering; Industrial Processes / New Products; Medical Biotechnology.

Submission of manuscripts

Submission of a paper to the Journal of Biotechnology implies: (1) that it is not being submitted for publication elsewhere; (2) the transfer of the copyright from the author to the Publisher.

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

Types of papers

- (1) *Full-length papers*, generally not exceeding 15 typewritten pages. Full-length papers should:
 - (a) be divided into sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion);
 - (b) contain an Abstract, not exceeding 200 words, at the beginning of the paper, followed by 3-6 keywords;
 - (c) not exceed 10-12 printed pages (approximately 15 typewritten pages) including the space required for figures. Longer papers will be considered, but may be subject to delayed publication.
- (2) *Short Communications*, not exceeding 1500 words or equivalent space including figures and

tables. These must be brief definitive reports and not preliminary findings. Short communications may not be divided into Materials and Methods, Results and Discussion, instead, Materials and Methods may be described in the text or, if appropriate, in figure legends or table footnotes.

(3) *Reviews* will be published following invitation from Review Editor or by the suggestion of authors.

(4) *Special Issues* on highlighted aspects of biotechnology are also published. Special Issues may contain selected contributions from international meetings, or a collection of papers on a specific topic, and may be composed of review articles, research papers, and short notes. Guest Editors responsible for the organisation of Special Issues will be invited by the Editors of the Journal, but may also be suggested by scientists who are willing to organize a special issue on a topic that deserves publication.

(5) *Letters to the Editor* and announcements of meetings and courses will be included at the discretion of the Editors and the Publisher.

(6) *Supplements* will be published at the discretion of the Publisher in consultation with the Chief Editor. Please contact the Publishing Editor direct for further information: Monique Lamine, Journal of Biotechnology, Elsevier, Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, E-mail: m.lamine@elsevier.com

Manuscripts

The manuscript should be typed with double spacing and wide margins, and should be accompanied by a separate title page giving the authors' names and affiliations, as well as an address for correspondence including fax number and e-mail address. If it is a resubmission this has to be indicated and the former J. Biotechnol. MS No. has to be given. All pages have to be numbered consecutively, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgement of the present manuscript should be enclosed to facilitate reviewing.

For the title, avoid numbered series titles.

In the Abstract, avoid abbreviations and references. The Abstract should be followed by up to six Keywords.

The Material and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When experimental conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure. For commonly used methods a simple reference is sufficient. If several alternative methods are described in the paper cited, please identify the method briefly in addition to the reference. Describe new methods completely.

Present the Results as concise as possible in either table(s) or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. The Results and

Discussion sections may be combined.

References should be assembled on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. and year in brackets. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should follow the examples below:

Ponti, C., Sonnleitner, B. and Fiechter, A. (1995) Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 1. Operating conditions. *J. Biotechnol.* 38, 173-182. Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D. (1985) Partitioning in aqueous two-phase systems. Academic Press, Inc., Orlando, FL. Hamer, G. (1989) Fundamental aspects of aerobic thermophilic digestion. In: Bruce, A.M., Colin, F. and Newman, P.J. (Eds.), *Treatment of Sewage Sludge: Thermophilic Aerobic Digestion and Processing Requirements for Landfilling*. Elsevier Applied Science, London, pp. 2-19.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations, International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8.

Tables should be typed double-spaced on separate sheets, numbered consecutively with Arabic numerals, and only contain horizontal lines. A short descriptive title should appear above each table, with possible legend and footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Figures should be line drawings in black ink. Figures should be completely labeled, the size of the lettering being appropriate to that of the drawing, taking into account the necessary reduction in size. All legends should be typed double-spaced on separate sheets. If figures are not to be reduced their format should not exceed 16.0 x 20.2 cm. Colour reproduction is possible. Authors wishing to publish colour figures will be expected to pay for their production costs. Figure legends have to be submitted on separate sheets.

Equations have to be numbered consecutively.

Nomenclature. A list of symbols and abbreviations (e.g., of enzymes) should be provided. 'Fermentation' and 'fermenter' have become very ambiguous expressions and, therefore, should be avoided in this Journal. Preferably use other expressions such as cultivation or bioreactor, respectively. Units and Dimensions should be expressed according to IUPAC nomenclature, e.g.

Time, s, min, h, d, a; Mass, ng, mg, g, kg, t;

Length, nm, mm, cm, m, km; Volume, l, ml; Dalton, Da, for molecular mass.

Molecular weight has no dimension.

Negative powers should be used instead of fractions, e.g., g l⁻¹ h⁻¹, nmol ml⁻¹, etc.

Dimensions should not be mixed with specifications, e.g., protein per biomass (g g⁻¹) instead of g protein/g biomass.

Scientific and Engineering Symbols. Growth kinetics and cultivation: As recommended by the International Commission at the 2nd Int. Symposium on Cont. Cultivation of Microorganisms, Prague 1962 (Proceedings published by Academic Press, New York, p. 379, 1962). Other symbols: as per 'Perry's Chemical Engineering Handbook'.

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the ***printed article***, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the ***electronic copy***, the accession number text will be linked to the appropriate

source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

All questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to: Elsevier Ireland Ltd., Issue Manager Journal of Biotechnology, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, E-mail. d.cusack@elsevier.com.

Proofs will be sent to the first-named author of an article, unless an alternative is requested on the title page of the manuscript. They should be checked carefully and returned within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: no changes in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage.

Page charges will not be made.

Reprints may be ordered by filling in and returning to the Publishers the order form sent to the author with the proofs. Twenty-five free offprints per contribution will be made available.