

Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato

Biosurfactant production by Pseudomonas fluorescens UCP 1514 using corn steep as substrate

Thayse Alves de Lima e Silva

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática (DESQ), Faculdade de Engenharia Química (FEQ), Universidade Estadual de Campinas, Av. Albert Einstein nº 500, caixa postal, 6066, Barão Geraldo CEP: 13083-970 - Campinas - SP - Brasil. ithalv@yahoo.com.br

Juliana Moura de Luna

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, nº 42 Bloco J, Boa Vista - CEP: 50050-590 - Recife - PE - Brasil. juliana_mouraluna@yahoo.com.br

Marcos Antônio Moraes Filho

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, nº 42 Bloco J, Boa Vista - CEP: 50050-590 - Recife - PE - Brasil. marcosamf@hotmail.com

Elias Basile Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática (DESQ), Faculdade de Engenharia Química (FEQ), Universidade Estadual de Campinas, Av. Albert Einstein nº 500, caixa postal, 6066, Barão Geraldo CEP: 13083-970 - Campinas - SP - Brasil. eliastam@feq.unicamp.br

Galba Maria de Campos Takaki

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, nº 42 Bloco J, Boa Vista - CEP: 50050-590 - Recife - PE - Brasil.

Biossurfactantes são surfactantes naturais produzidos por microrganismos, sendo classificados de acordo com a composição química, origem microbiológica e massa molecular. Neste sentido, a produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP1514 foi estudada para avaliar a influência dos componentes do meio: óleo de semente de girassol (pós-fritura), óleo queimado de motor e milhocina, na redução da tensão superficial. Menores valores de tensão (31,68 e 33,72 mN / m) foram obtidos nas condições dos meios contendo, respectivamente, (5% de milhocina e 5% de óleo queimado de motor) e (10% milhocina e 5% óleo de girassol pós-fritura). A cinética de crescimento do microrganismo demonstrou que a fase estacionária foi atingida a partir das 24 horas de cultivo. Os maiores índices de emulsificação foram observados em óleo de milho e petróleo. Os resultados indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes potentes a partir de meio de baixo custo formulado com milhocina.

Palavras-chave: Biossurfactante. Milhocina. *Pseudomonas fluorescens*. Tensão superficial.

Biosurfactants are natural surfactants produced by microorganisms, being classified in accordance with their chemical composition, microbial origin and molecular mass. In this way, the production of a biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* UCP1514 was initially studied to evaluate the influence of the following culture medium components, named: sunflower seed oil (post-frying), burned oil of motor and industrial waste (corn steep) on the surface tension reduction. The best surface tension (31,68 and 33,72 mN / m) were found in medium containing, respectively, (5 % corn steep and 5% and burned oil of motor) and (10% of corn steep and 5% sun flower oil post-frying). The growth kinetics demonstrated that the stationary phase was reached in the first 24 hours of cultivation. The best emulsification indexes had been observed with corn oil and Oil. The promising results obtained indicate the viability of powerful biosurfactants produced from low-cost medium based on corn steep.

Key words: Biosurfactant. Corn Steep. *Pseudomonas fluorescens*. Surface tension.

1 Introdução

A poluição ambiental provocada por óleos e derivados de petróleo é um problema que atinge proporções mundiais e a cada ano o acúmulo de resíduos oleosos emitidos por indústrias de diversos ramos aumenta drasticamente (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Um dos problemas associados à biodegradação de compostos hidrofóbicos os quais incluem os hidrocarbonetos do petróleo é sua ligação às partículas do solo e a pouca solubilidade de água resultando em baixa biodisponibilidade para os microrganismos, o que pode retardar ou mesmo paralisar o processo de degradação. Um dos métodos mais investigados para a resolução deste problema é a utilização de compostos surfactantes (VAN HAMME et al.; 2006).

Neste contexto, destacam-se os produtos metabólicos de vários microrganismos, os chamados biossurfactantes, os quais constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com sua composição química ou origem microbiológica (RON & ROSENBERG, 2001; HUA et al, 2003).

A pesquisa na área dos biossurfactantes vem crescendo cada vez mais nos últimos anos, devido ao seu alto potencial e uso nas diferentes áreas, como indústria alimentícia, farmacêutica, petroquímica, entre outras (SOUMEN et al, 2006; PATTANATHU et al, 2008).

Os biossurfactantes são utilizados nos processos de biorremediação, por apresentar capacidade de degradar substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, auxiliando assim ao processo de despoluição, contudo, podem também produzir substâncias com propriedades emulsificantes (MULLIGAN, 2005; PATTANATHU et al, 2008).

Esses biopolímeros, apesar da diversidade de aplicações industriais, ainda não são amplamente

utilizados devido aos elevados custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação do produto, bem como o uso de substratos caros.

No entanto, o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através da utilização de fontes alternativas facilmente disponíveis e de baixo custo. Os efluentes das indústrias de óleo vegetal, óleo de resíduos petroquímicos e subprodutos das indústrias alimentares têm sido amplamente estudados para a produção microbiana em escala experimental (MERCADÉ et al, 1993; MERCADÉ et al, 1997; VOLLBRECHT et al, 1999; DELEU & PAQUOT, 2004).

A produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 2,5 a 3 milhões/ano, sendo 75% derivados de plantas. A maioria dos óleos e gorduras é usada na indústria alimentícia a qual gera grandes quantidades de resíduos graxos de extração das sementes oleaginosas. O acúmulo destes resíduos tem aumentado a utilização destes materiais para a transformação microbiana (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa não convencional, para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Resíduos de destilaria (DUBEY; JUWARKAR, 2001), derivados de petróleo (ALBUQUERQUE et al, 2006), melão (PATEL; DESAI, 1997) e efluente de óleo de oliva (MERCADÉ et al, 1993), entre outros, têm sido descritos como substratos importantes para a produção de biossurfactantes (RUFINO et al, 2007; SARUBBO et al, 2007).

O gênero *Pseudomonas* particularmente, *Pseudomonas fluorescens*, está envolvida com a conservação ambiental, considerando a habilidade de degradação de compostos xenobióticos. Além disso, esse microrganismo apresenta habilidade também para usar substratos hidrofílicos como glicerol, manitol, frutose, glicose e óleos vegetais

para produzir biossurfactantes do tipo ramino-lipídeos (KOCH et al, 1991; DESAI, BANAT, 1997ABOUSEOUD et al, 2008).

Portanto, o presente trabalho foi desenvolvido visando produzir agentes surfactantes a partir de *Pseudomonas fluorescens*, utilizando milhocina como substrato de baixo custo, visando aplicação como coadjuvante na redução da poluição ambiental provocada por compostos hidrofóbicos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Microrganismo: A bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi isolada de sedimentos de mangue do Rio Formoso, Pernambuco, e pertence à Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, cadastrada na Federation Culture Collection–FCC, sob o número UCP 1514. A cultura foi mantida no meio Luria Bertani (LB), à temperatura de 5°C.

Substratos: Para a produção do biossurfactante, foram utilizados três tipos de substratos: milhocina, subproduto do beneficiamento do milho, gentilmente cedida pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho–PE, como substrato solúvel. O óleo queimado de motor, derivado de petróleo utilizado em motores de automóveis, como substrato hidrofóbico. E ainda, o óleo de girassol, produzido pela indústria Mazzola, após fritar batatas por sete dias consecutivos, sendo denominado de óleo pós-fritura, utilizado como substrato insolúvel.

Meio de cultura: Para crescimento foi utilizado o meio agar nutriente– AN [(g.L⁻¹) peptona 10,0g; extrato de carne 3,0g; NaCl 5,0g; água destilada q.s.p 1000ml; pH 7,0] e para o processo fermentativo da *Pseudomonas* foi utilizado o meio líquido Luria Bertani –LB [triptona 10g; extrato

de levedura 5g; Cloreto de sódio 5g; Glicose 5g; água destilada q.s.p 1000mL; pH 6,5–7,0].

2.2 Métodos

Condições de cultivo e produção de biossurfactante

Preparação do inóculo: A *P. fluorescens* foi mantida no meio LB, sob agitação orbital de 150 rpm, a 37°C por 16 horas, para obtenção do pré-inóculo correspondente a 10⁷ UFC/mL.

Meio de Produção: O meio de produção foi formulado com o resíduo industrial milhocina solubilizada em água destilada. Duas combinações foram inicialmente testadas com os respectivos substratos: (1) milhocina e óleo de motor queimado; (2) milhocina e óleo de girassol. Tais combinações foram testadas em diferentes concentrações, de acordo com a Tabela 1. As combinações foram utilizadas para analisar a interação das concentrações sobre a tensão superficial e posteriormente, selecionar a melhor condição de concentração milhocina/substrato. Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, sendo o pH final ajustado para 6,0.

Tabela1: Concentrações dos substratos utilizados no cultivo de *Pseudomonas fluorescens*

Condições	Concentração do substrato (%)		
	Milhocina	Óleo motor queimado	Óleo de girassol queimado
A	5.0	5.0	–
B	10.0	5.0	–
C	5.0	10.0	–
D	10.0	10.0	–
E	0.75	0.75	–
F	5.0	–	5.0
G	10.0	–	5.0
H	5.0	–	10.0
I	10.0	–	10.0
J	07.mai	–	07.mai

Fonte: Os autores.

Produção de biossurfactante: As fermentações para produção foram realizadas em frascos de Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL do meio e inoculados com uma suspensão de 10^7 UFC/mL do pré-inóculo, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, a 37°C por 96 horas de incubação. O líquido metabólico livre de células foi obtido por centrifugação a 10.000 g, por 15 min a 6°C, seguido de filtração em filtro Millipore de 0,22µm, sendo submetido à determinação do pH, índice de emulsificação e a tensão superficial.

Crescimento celular: O crescimento celular foi avaliado através da técnica de *pour plate*, inoculando alíquotas de 0,1 mL de cada condição em placas de Petri, contendo meio Agar nutriente – AN. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas, seguido da contagem das colônias viáveis. Os resultados do crescimento foram expressos em UFC/mL.

Determinação do pH: O Comportamento do pH das fermentações foi avaliado por potenciometria durante as 96 horas de incubação.

Índice de emulsificação: Para a determinação do índice de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 20 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987) onde 1,0 ml de cada um dos hidrocarbonetos (Petróleo – proveniente da plataforma da cidade do Recôncavo Baiano–Salvador–BA, de campo maduro; Óleo Diesel – proveniente de aeronaves, gentilmente cedido pela Petrobrás; Óleo de milho – Bunge Alimentos S.A.; n-Hexadecano – Sigma Chemical Co.) foram adicionados 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 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.

Determinação da Tensão superficial: A determinação da tensão superficial foi realizada em tensiômetro automático (modelo Sigma 70 KSV Ltd., Finland), utilizando um anel de platina – iridium. As análises foram realizadas a 25° C e o aparelho foi previamente calibrado conforme o método descrito por Du Nöuy (COOPER et al, 1979).

3 Resultados e Discussão

3.1 Seleção da melhor condição de produção do biossurfactante

A redução da tensão superficial é utilizada como um critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade em reduzir a tensão superficial (YOUSSEF et al, 2004; SHEPHERD et al, 1995).

Neste sentido, os ensaios realizados para a produção do agente surfactante por *P. fluorescens* foram avaliados, variando as concentrações iniciais da milhocina, e dos substratos óleo de motor queimado e óleo de girassol pós-fritura, de acordo com a Tabela 1, com a finalidade de analisar a alteração na tensão superficial.

De acordo com a Tabela 2, os resultados obtidos demonstraram que a redução da tensão superficial foi observada no cultivo para a combinação (1), a condição (A), contendo 5% da milhocina e 5% do óleo queimado de motor e para a combinação (2), a condição (G), contendo 10% da milhocina e 5% do óleo de girassol pós-fritura, uma vez que a tensão superficial da água foi redu-

zida de 70 mN m^{-1} para $31,68 \text{ mN m}^{-1}$ e $33,72 \text{ mN m}^{-1}$, para as condições (A) e (G), respectivamente.

Tabela 2: Efeito das combinações dos substratos (milhocina, óleo de motor queimado e óleo de girassol) utilizados no crescimento de *P. fluorescens* sobre a tensão superficial, após as 96 horas de cultivo

Condições	Tensão superficial (mN/m)	
	Combinação 1 (milhocina + óleo motor queimado)	Combinação 2 (milhocina + óleo de girassol pós-fritura)
A	31,68	-
B	32,03	-
C	35,91	-
D	41,91	-
E	37,76	-
F	-	35,14
G	-	33,72
H	-	39,63
I	-	35,51
J	-	36,84

Fonte: Os autores.

O biossurfactante de *P. fluorescens* demonstrou maior capacidade em reduzir a tensão do que os surfactantes produzidos por *C. antarctica* (35 mN m^{-1}) (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000) e de *Yarrowia lipolytica* (50 mN m^{-1}) (AMARAL et al, 2006).

3.2 Produção de biossurfactante e Cinética de Crescimento de *Pseudomonas fluorescens*

As Figuras 1 e 2 mostram a cinética de crescimento do microrganismo *P. fluorescens* cultivada nas condições (A) com 5% de milhocina e 5% de óleo queimado de motor e (G), com 10% de milhocina e 5% de óleo de girassol pós-fritura. A cinética demonstrou um perfil diaúxico, entre 12 e 24 horas, atingindo a fase estacionária a partir das 24 horas de cultivo, refletindo-se na curva de crescimento, pH e na redução da tensão. O pH aumentou nas primeiras 24 horas de cultivo e, ao final da fermentação, atingiu valores de 8,5 e 7,0, para

as condições (A) e (G), respectivamente e. A tensão superficial do meio diminuiu nas primeiras 12 horas de cultivo, atingindo os valores em torno de 31 mN m^{-1} a partir das 24 horas, para os substratos milhocina e óleo de motor queimado e 32 mN m^{-1} para os substratos milhocina e óleo de girassol pós-fritura, ao final das 96 horas de incubação.

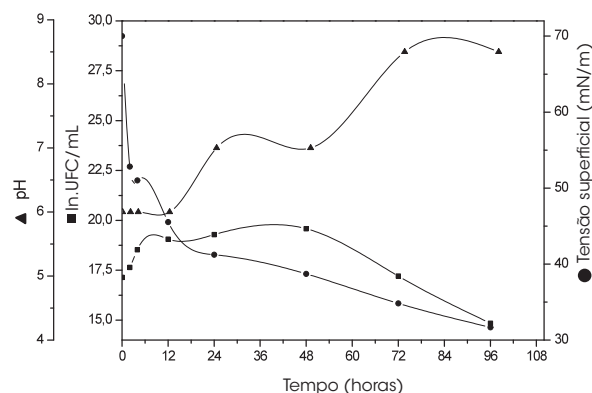


Figura 1: Produção de biossurfactante por *P. fluorescens* durante o cultivo na condição (A), combinação 1, em meio contendo: 5% de milhocina e 5% de óleo de motor queimado. Biomassa produzida, pH e tensão superficial

Fonte: Os autores.

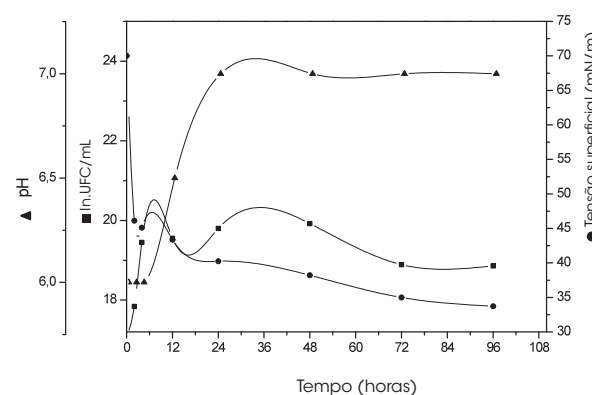


Figura 2: Produção de biossurfactante por *P. fluorescens* durante o cultivo na condição (G), combinação 2, em meio contendo: 10% de milhocina e 5% de óleo de girassol pós-fritura. Biomassa produzida, pH e tensão superficial

Fonte: Os autores.

Provavelmente, o aumento do pH está relacionado ao consumo da fonte de nitrogênio

existente na milhocina. Portanto, sugere-se que *P. fluorescens* é capaz de usar como nutrientes o resíduo industrial (milhocina) e os substratos hidrofóbicos óleo de motor queimado e óleo de girassol pós-fritura confirmando assim, a sua habilidade de utilizar vários substratos, demonstrando ainda, uma relação ideal de C:N na promoção do crescimento (KOCH et al, 1991; DESAI & BANAT, 1997; SOUMEN et al, 2006; ABOUSEOUD et al, 2007). O efeito do pH na atividade superficial tem sido reportado para biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos (ABU-RUWAIDA et al, 1991).

Resultados similares foram encontrados por Abouseoud e colaboradores (2008), em que, *P. fluorescens* apresentou excelente crescimento e produção de biossurfactante em diferentes substratos na fase estacionária, sendo observado que o aumento do pH durante a fermentação apresenta-se como um efeito positivo na redução da tensão e na estabilidade da emulsão. Uma importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na redução da tensão superficial de soluções aquosas (NITSCHKE et al, 2004; YOUSSEF et al, 2004).

Haba e colaboradores (2000) realizaram a seleção de 36 microrganismos para produção de biossurfactante em meio de cultura líquido, contendo 2% de resíduo de óleo de oliva ou óleo de girassol como fonte de carbono, baixando a tensão superficial para 40mN/m, essa medida foi utilizada como critério de seleção. Após 72 horas de crescimento, muitas espécies de *Pseudomonas* testadas apresentaram crescimento celular e produção de biossurfactante satisfatórias, sendo a tensão superficial de 35mN/m. Os resultados obtidos são corroborados pelas investigações de Levisaukas e colaboradores (2004), demonstrando que carbono e nitrogênio são nutrientes específicos para estimular a taxa de crescimento celular.

Os maiores índices de emulsificação foram obtidos para petróleo, óleo de milho e óleo diesel, respectivamente, para a condição (A), e petróleo e óleo de milho, para a condição (G) (Figuras 3,4 e 5). Estes resultados sugerem que a atividade de emulsificação depende mais da afinidade com os substratos hidrocarbonados, a qual envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto do que sobre a tensão superficial do meio.

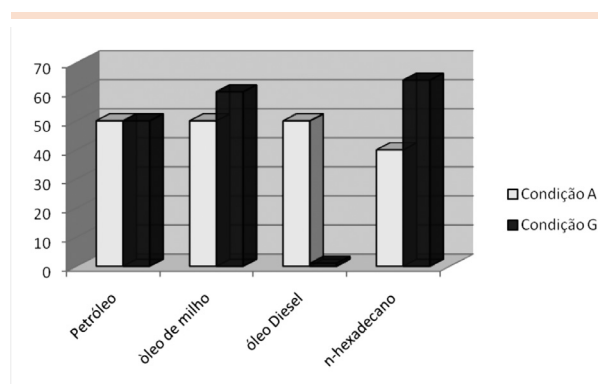


Figura 3: Índice de emulsificação de diferentes substratos oleosos do biossurfactante de *P. fluorescens*, após as 96 horas de cultivo nas condições (A), com 5% de milhocina e 5% de óleo de motor queimado e (G), com 10% de milhocina e 5% de óleo de girassol pós-fritura

Fonte: Os autores.

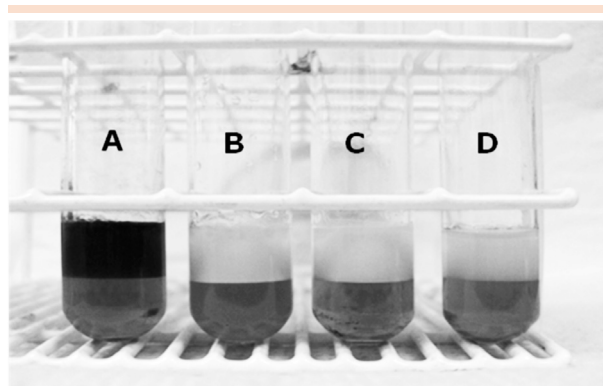


Figura 4: Índice de emulsificação do biossurfactante de *P. fluorescens* Condição A (meio com 5% de milhocina e 5% de óleo de motor queimado após 96 horas de cultivo). Substratos: A - Petróleo, B - óleo de milho, C - óleo Diesel e D - n-hexadecano

Fonte: Os autores.

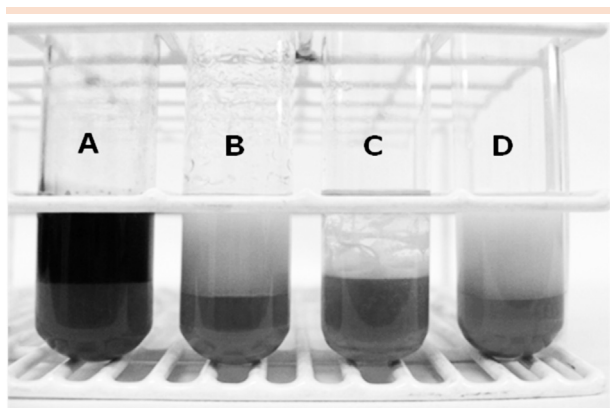


Figura 5: Índice de emulsificação do biossurfactante de *P. fluorescens* Condição G (meio com 10 % de milhocina e 5% de óleo de girassol pós-fritura, após 96 horas de cultivo). Substratos: A – Petróleo, B – óleo de milho, C – óleo Diesel e D – n-hexadecano

Fonte: Os autores.

Resultados similares foram obtidos para *Rhodococcus* cultivada em hidrocarbonetos (ABU-RUWAIDA et al, 1991). Estudos demonstraram que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (URUM; PEKDEMIR; COPUR, 2004). É importante ressaltar que o biossurfactante produzido nas condições estabelecidas nesse trabalho demonstra aplicabilidade como agente surfactante, além de poder atuar também como agente emulsificante.

4 Conclusões

A nova linhagem de *P. fluorescens* demonstrou grande potencial biotecnológico em se desenvolver em meio de baixo custo formulado com milhocina e produzir agentes surfactantes com capacidade tensoativa e emulsificante, sugerindo investigações futuras para aplicação nos processos de descontaminação ambiental.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FINEP e FACEPE.

Referências

- ABOUSEOUD, M.; MAACH, R.; AMRANE, A. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Trends in Applied Microbiology*, p. 340–347, 2007.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, p. 143–151, 2008.
- 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.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 313–316, 2000.
- ALBUQUERQUE, C.D.C.; FILETTI, A.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal Microbiology*, v. 52, n. 6, p. 575–583, 2006.
- 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. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1894–1898, 2006.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*, *Applied Environmental Microbiology*, v.37, n.1, p. 4–10, 1979.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology*, v. 53, p. 224–229, 1987.
- 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.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 61, p.47–64, 1997.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 61–69, 2001.
- HABA E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. *Journal Applied Microbiology*, v. 88, p. 379–387, 2000.

- HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S. AND WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research*, v. 37, p. 4143 – 4150, 2003.
- KOCH A.K.; KAPPELI O.; FIECHTER A.; REISER J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 4212–4219, 1991.
- LEVISAUKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Letters*, v. 26, p. 1141–1146, 2004.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 428–434, 2002.
- MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, v. 43, p. 1–6, 1993.
- MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Tecnology*, v. 431, p. 1–6, 1997.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183–198, 2005.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p. 81–85, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772–776, 2002.
- PATEL, R.M. ; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters Applied Microbiology*, v. 25, p. 91–94, 1997.
- PATTANATHU, K.S.M.R.; EDWARD, G. Production, characterization and applications of biosurfactants – Review. *Asian Network for Scientific Information*, v. 7, n. 2, p. 360–370, 2008.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v. 3, p. 229–236, 2001.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M., Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 23, p.734–741, 2007.
- 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.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, v. 40, p. 207–217, 1995.
- SOU MEN, M.; PALASHPRIYA, D.; RAMKRISHNA, S. Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends Biotechnology*, v. 24, p. 509–515, 2006.
- URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 276, p. 456–464, 2004.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.W. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, p. 604–620, 2006.
- 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.
- YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MC INERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, p. 339–347, 2004.

Recebido em 29 set. 2009 / aprovado em 9 fev. 2010

Para referenciar este texto

SILVA, T. A. de L. e et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milho-cina como substrato. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.