

POTENCIALIDADE DE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

CULTURES POTENTIALITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FOR THE BIOSURFACTANT PRODUCTION

Cristian Jacques Bolner de Lima^{1*}, Eliana Flávia Camporese Sérvulo² e Vicelma Luiz Cardoso¹

¹Universidade Federal de Uberlândia – FEQ – Campus Santa Mônica, Bloco 1K – Caixa Postal 593
CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG Brasil

*E-mail: cristianjbl@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química. Caixa Postal 68502
CEP: 21945-970 Rio de Janeiro, RJ Brasil.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo principal investigar a produção de biosurfactante a partir de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, uma proveniente de coleção de cultura (ATCC 9027) e outra isolada de solo contaminado de hidrocarboneto (PALC). Para avaliar os resultados dos experimentos foi utilizado um planejamento experimental fatorial, estudando como variáveis as concentrações de óleo de soja residual proveniente da fritura de vários alimentos, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de produção, mantidos em shaker rotatório, a 170 rpm e temperatura de 30±1 °C por um período de 48 h de fermentação. A produção de biosurfactante foi monitorada através das determinações da concentração de raminose, tensão superficial e atividade emulsificante. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio inicial de 62 ± 1 dina/cm para 26,0 dina/cm e 28,0 dina/cm, produzir raminose na concentração de 1,39 e 0,59 g/L com índice de emulsificação de 100%, respectivamente. Após recuperação e purificação do biosurfactante a concentração de raminose aumentou em 80% no produto final.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactante, óleo de soja, tensão superficial.

ABSTRACT

This work has as main objective to investigate the production of biosurfactant by strain of *Pseudomonas aeruginosa*, an originating from culture collection (ATCC 9027) and another isolated from a hydrocarbon contaminated soil (PALC). To evaluate the results of the experiments a factorial experimental design was used, studying as variables the concentrations of residual soybean oil from several foods frying, nitrate of ammonium and brewery residual yeast. The experiments were performed in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of production medium, maintained in the rotary shaker, at 170 rpm and 30 ± 1 °C, for a 48-h fermentation period. Biosurfactant production has been monitored by measurements of rhamnose concentration, surface tension and emulsifying activity. The strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Pseudomonas aeruginosa* isolated were capable to reduce the superficial tension of the initial medium of 61± 1 dynes/cm for 26,0 dynes/cm and 28,0 dynes/cm, to produce rhamnose in the concentration of 1,39 and 0,59 g/L with emulsification index of 100%, respectively. After recuperation and purification of the biosurfactant the rhamnose concentration increased in 80% in the final product.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, soybean oil, surface tension.

1 – INTRODUÇÃO

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e/ou possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biosurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias e fungos (BANAT, 1991).

Os glicolipídeos são os surfactantes microbianos mais conhecidos. Estes compostos são constituídos por carboidratos associados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Dentre os glicolipídeos mais estudados, encontram-se os raminolipídeos que são compostos que apresentam em sua estrutura 1 ou 2 moléculas de raminose ligadas a 1 ou 2 moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (DESAI e BANAT, 1997).

Surfactantes produzidos microbiologicamente, oferecem várias vantagens sobre seus equivalentes químicos, tais como: baixa toxicidade, tolerância à temperatura, pH e força iônica, além da possibilidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis (LIN et al, 1993).

Até o presente momento, o uso dos biosurfactantes nas indústrias é limitado devido aos altos custos de produção e recuperação, em comparação aos surfactantes quimicamente sintetizados. Contudo, nos últimos anos muita atenção vem sendo destinada aos biosurfactantes, devido à diversidade de sua estrutura química (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Esta diversidade possibilita que estes compostos apresentem uma ampla variedade de propriedades físico-químicas que incluem emulsificação,

solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade, entre outras (MULLIGAN et al, 1989).

Assim, os surfactantes químicos podem ser substituídos pelos biosurfactantes em muitas áreas de aplicação como agricultura, construção, limpeza de equipamentos industriais, indústrias de alimentos, bebidas, couro, papel, têxtil, metal, cosmético, farmacêutica, petrolífera e petroquímica (ROBERT et al., 1991; BERTRAND et al., 1994).

A economia é um grande desafio nos processos biotecnológicos, especialmente para a produção de biosurfactantes. O sucesso para a sua produção depende do desenvolvimento de processos mais baratos e a utilização de matéria prima de baixo custo, as quais, não devem ultrapassar 10 a 30% os custos do produto final (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

A maior parte dos relatos encontrados na literatura sobre a utilização de produtos ou subprodutos agroindustriais, está relacionada a produtos puros como carboidratos e óleos vegetais. No entanto, pouco tem sido publicado sobre a utilização dos resíduos hidrofóbicos como substratos gerados de frituras de alimentos provenientes de óleos vegetais (HABA et al, 2000).

No Brasil, parte do óleo vegetal residual do consumo humano é destinada à fabricação de sabões ou de rações para animais, entretanto, a maior parte é descartado na rede de esgotos, um crime ambiental inadmissível. A pequena solubilidade dos óleos vegetais na água constitui um fator negativo no que se refere à sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para abastecimento público, causam problemas no tratamento da água (MITTELBAACH e TRITTHART, 1988).

As células de levedura apresentam alto teor protéico, entre 30 a 70%, e são ricas em vitaminas e em minerais essenciais (HALÁSZ e LÁSZTITY, 1991). Alguns problemas restritivos ao uso de leveduras na alimentação humana e de animais monogástricos estão relacionados com a rigidez da sua parede celular e ao elevado teor de ácidos nucléicos (SHETTY e KINSELLA, 1982). Por outro lado, devido ao alto teor orgânico da levedura, o descarte da biomassa cervejeira só pode ser efetuado após um adequado tratamento. Por isso, é de interesse desenvolver tecnologias que permitam obter produtos de alto valor agregado empregando este rejeito cervejeiro (FURCO, 1996).

Com o espírito de substituir os surfactantes químicos por produtos de baixa ou nenhuma toxicidade, utilizando matéria prima proveniente de resíduo e conseqüentemente diminuindo o custo de produção desse bioproduto, este trabalho teve como principais objetivos determinar a potencialidade de uma linhagem isolada de *Pseudomonas aeruginosa* (PALC) em produzir biosurfactante e/ou emulsificante a partir de óleo de soja proveniente da fritura de vários alimentos (óleo de soja residual), nitrato de amônio e resíduo de biomassa cervejeira autolizado, utilizando um planejamento experimental fatorial. Para comparação, o mesmo estudo foi feito para uma linhagem proveniente de coleção de cultura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizadas duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027, cedida pelo Dr. Ivano de Fillipis (INCQS/FIOCRUZ), e a PALC, isolada de solo de uma lagoa contaminada com óleo diesel e gasolina, localizada na Fazenda Rio das Pedras no Município de Uberlândia. Ambas as culturas foram mantidas em agar nutriente (DIFCO 0003) à 4°C. Esta cultura foi identificada por métodos bioquímicos clássicos nos laboratórios da FIOCRUZ.

2.2 Meios de cultura

O crescimento das culturas bacterianas foi realizado em meio apresentando a seguinte composição (g/L): NH_4NO_3 1,7; Na_2HPO_4 7,0; KH_2PO_4 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; extrato de levedura 5,0 e glicose 10,0. Após ajuste do pH a 7,0 com solução de HCl 0,01N, o meio foi autoclavado à 121 °C por 15 minutos.

O meio de produção (MPB) consistia dos sais utilizados no meio de crescimento acrescido de óleo de soja residual, levedura cervejeira residual e nitrato de amônio na concentração do experimento.

2.3 Preparo do inoculo

Três alçadas da cultura estoque foram cultivadas em 100 mL do meio acima descrito, à 30 ± 1 °C e 170 rpm por 24 horas.

2.4 Experimentos

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio. Após inoculação com 5 mL do pré-cultivo (item 2.3), os cultivos foram agitados a 170 rpm em incubadora rotativa por um período de 48 horas a 30 ± 1 °C.

Para determinar as melhores condições de produção do biosurfactante realizou-se um planejamento experimental a dois níveis com quatro variáveis, sendo elas: concentração de óleo de soja residual, concentração de nitrato de amônio, concentração de levedura cervejeira residual e linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Como respostas, adotaram-se as seguintes análises: produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular. Os cálculos foram realizados utilizando o software Statística 5.1.

Definido o planejamento a dois níveis, estabeleceu-se os níveis superiores e inferiores para concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio baseado em consultas bibliográficas (ABALOS et al, 2001; RAHMAN et al, 2002; BENINCASA et al, 2002; SANTA ANNA et al, 2002, BANAT et al, 2002; SANTOS et al, 2002). Com relação à concentração de levedura cervejeira residual adotou-se zero g/L como nível inferior como valor real para verificar se tal condição influenciaria ou não as respostas estudadas. Como nível superior utilizou-se

10 g/L com base na literatura, considerando a concentração de extrato de levedo normalmente presente em meios de crescimento (SANTOS *et al*, 2002, MORIKAWA *et al*, 2000; FOX *et al*, 2000).

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Concentração de raminose

Foi determinada de acordo com o método descrito por RAHMAN *et al.* (2002).

2.5.2 Recuperação e purificação de biotensoativos

Para realizar a extração e a purificação dos raminolipídeos foi necessário recuperá-los do caldo de cultura. Para isso, utilizaram-se os métodos de extração orgânica (clorofórmio/etanol) de acordo com o método descrito por SANTA ANNA *et al* (2002) e de purificação por coluna de adsorção (troca iônica), o caldo de cultivo (livre de células) foi eluído em coluna de adsorção contendo resina de poliestireno Amberlita XAD-2 (Supelco), como descrito por REILING *et al* (1986). O cálculo da porcentagem de aumento na concentração de raminose na solução após a extração em relação a concentração no caldo fermentado (CR), foi realizado através da equação:

$$CR = (B - A)/A \quad (1)$$

sendo, B a concentração de raminose na solução após a extração e A a concentração de raminose no caldo fermentado.

2.5.3 Tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada em tensiômetro marca Fisher modelo 21 utilizando um anel de platina-iridium. As análises foram realizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e o aparelho foi previamente calibrado conforme o método descrito por Du Nouy (COOPER e ZAJIC, 1979).

2.5.4 Índice de emulsificação

A atividade emulsificante foi determinada para querosene de aviação conforme o método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no planejamento fatorial a partir das variáveis estudadas: concentração de óleo de soja residual (OSR), concentração de nitrato de amônio (NA) e concentração de levedura cervejeira residual autolizada (LCR), encontram-se na Tabela 1.

A partir das respostas obtidas para a produção de raminose (RM), tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE), construíram-se os diagramas de Pareto, indicados respectivamente, nas Figuras 1 (a), 2 (b) e 3 (c).

Através da Figura 1 (a), verifica-se que as variáveis que influenciaram na síntese da raminose foram X_1 (óleo de soja residual), X_2 (nitrato de amônio), X_3 (levedura cervejeira residual), X_4 (linhagem de microrganismo) e as seguintes interações: X_1X_4 , X_2X_3 e X_2X_4 .

Neste planejamento fatorial para a análise de todas as respostas, os parâmetros com nível de significância maior que 10 % em um teste de hipótese utilizando t de Student foram desprezados.

Tabela 1 - Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos experimentos com *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC.

Experimentos	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)	Microrganismo	RM (g/L)	IE (%)	TS (dina/cm)	X_F (g/L)
1	15	13	10	PALC	0,69	100	28,5	3,55
2	15	13	10	ATCC 9027	0,25	50	34,2	3,21
3	15	13	0	PALC	0,49	70	31,0	2,84
4	15	13	0	ATCC 9027	0,31	68	33,5	3,21
5	15	1	10	PALC	1,39	100	26,5	3,14
6	15	1	10	ATCC 9027	0,59	84	31,0	4,59
7	15	1	0	PALC	1,22	100	26,0	3,01
8	15	1	0	ATCC 9027	0,42	76	31,5	4,44
9	5	13	10	PALC	0,34	70	31,5	3,84
10	5	13	10	ATCC 9027	0,38	70	32,0	4,33
11	5	13	0	PALC	0,32	62	33,5	3,10
12	5	13	0	ATCC 9027	0,33	62	33,0	4,05
13	5	1	10	PALC	1,19	100	27,0	3,72
14	5	1	10	ATCC 9027	0,77	100	28,0	4,22
15	5	1	0	PALC	0,72	85	28,5	3,57
16	5	1	0	ATCC 9027	0,46	78	31,5	4,10

NOTA: Experimento ímpar utilizou a cultura isolada *P. aeruginosa* PALC (+1). Experimento par utilizou a cultura *P. aeruginosa* ATCC 9027 (-1). Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e -1 para a variável de menor concentração. Tensão superficial inicial do meio de produção $61 \pm$ dina/cm.

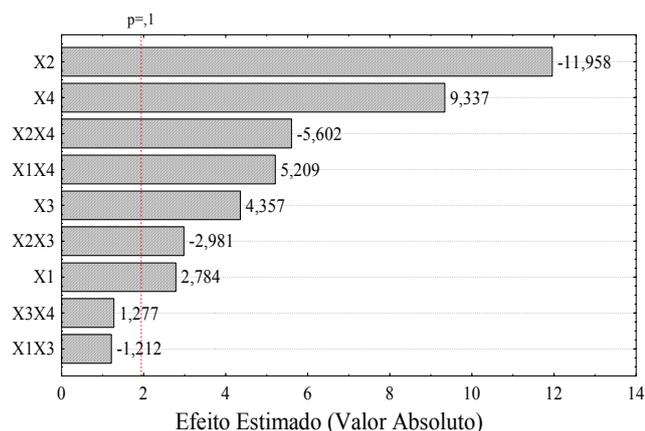


Figura 1 (a). Diagrama de Pareto, mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a produção de raminose.

Observa-se na Figura 1, que a variável que mais influenciou no aumento da concentração de raminose foi X_2 (nitrato de amônia). O sinal negativo desta variável significa que a redução na concentração de nitrato de amônio promove um aumento na produção de raminose. O sinal positivo referente a variável X_4 significa que esta variável quando passa de um nível -1 (*P. ATCC 9027*) para o nível 1 (*P. PALC*) a resposta raminose é aumentada.

Como a variável X_4 é uma variável qualitativa e a equação do modelo empírico deve ser em função das variáveis quantitativas, houve a necessidade de fazer a correção da equação ajustada substituindo a variável X_4 pelo valor -1 ou 1 de forma a maximizar a resposta. Este procedimento foi adotado para as demais equações ajustadas para as respostas TS, IE, e X_F . Sendo assim, a equação estimada para a resposta síntese de raminose fica em função das variáveis representadas pela Equação 2.

$$RM = 0,797 + 0,154X_1 - 0,334X_2 + 0,026X_3 \quad (2)$$

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação dessa equação, foi de 0,97, o que significa dizer que 97 % da variabilidade dos dados produção de raminose foram explicados pela Equação 2. Os sinais positivos das variáveis X_1 e X_3 mostram que os aumentos da concentração de óleo de soja residual e da concentração de levedura cervejeira residual promovem o aumento da produção de raminose.

Na Figura 2 (b), verifica-se as variáveis que mais influenciaram na tensão superficial (X_2 , X_3 , X_4 e a interação X_1X_4). A variável de maior significância no aumento da concentração de raminose foi X_2 . O sinal positivo desta variável significa que a redução na concentração de nitrato de amônio promove uma redução na tensão superficial. O sinal negativo referente a variável X_4 significa que esta variável quando passa de um nível -1 para o nível 1 a resposta tensão superficial é diminuída.

A equação empírica ajustada que representa a tensão superficial esta descrita na Equação 3.

$$TS = 28,89 - 0,936X_1 + 1,640X_2 - 0,625X_3 \quad (3)$$

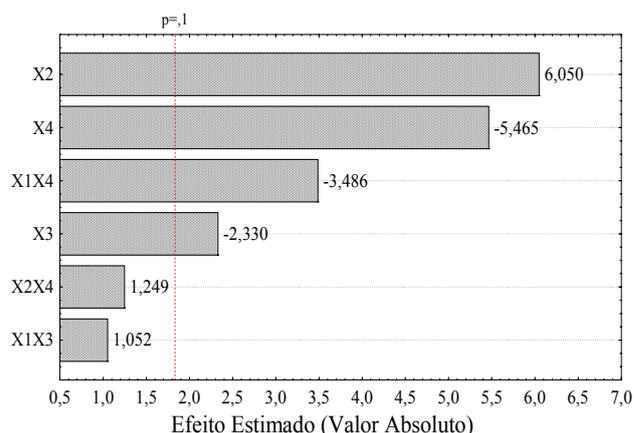


Figura 2 (b). Diagrama de Pareto, mostrando a contribuição das variáveis estudadas na síntese da tensão superficial.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação dessa equação foi de 0,88. Os sinais negativos das variáveis X_1 e X_3 mostram que o aumento na concentração de óleo de soja residual e na concentração de levedura cervejeira residual promove a redução na tensão superficial

A Figura 3 (c) apresenta as variáveis que influenciaram no índice de emulsão (X_2 , X_3 , X_4 e X_1X_4). Nota-se, também, que X_2 teve maior influencia no aumento da concentração de raminose. O sinal negativo desta variável significa que a redução na concentração de nitrato de amônio promove um aumento no IE.

O sinal positivo referente a variável X_4 significa que esta variável quando passa de um nível -1 (*P. PA9027*) para o nível 1 (*P. PAPC*) a resposta IE é aumentada. A Equação 4 ajustada para a resposta índice de emulsificação fica em função da variável correção X_1 , X_2 e X_3 .

$$IE = 85,875 + 5,312X_1 - 10,687X_2 + 4,562X_3. \quad (4)$$

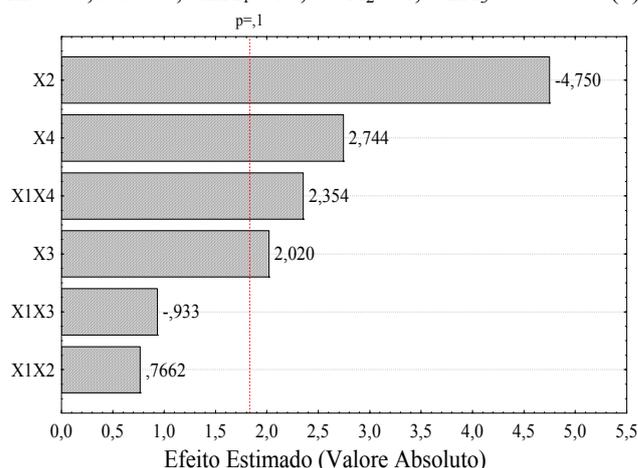


Figura 3 (c). Diagrama de Pareto, mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsão.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação dessa equação, foi de 0,979. Os sinais positivos das variáveis X_1 e X_3 mostram que aumentos das concentrações de óleo de soja residual e de levedura cervejeira residual proporcionam um aumento do índice de emulsificação (Experimentos 1 e 11; 5 e 15; 6 e 16).

A Equação 5 apresenta o modelo ajustado para o crescimento celular (X_F).

$$X_F = 4,012 - 0,114X_1 - 0,293X_2 + 0,078X_3 - 0,272X_1X_2 \quad (5)$$

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação dessa equação demonstra que 96 % da variabilidade dos dados para o crescimento celular foram explicados pela Equação 4. Os sinais das variáveis X_1 e X_2 mostram que a diminuição na concentração de óleo de soja residual e na concentração de nitrato de amônio promove o aumento no crescimento celular. O sinal positivo de X_3 informa que o aumento na concentração de levedura cervejeira residual proporciona um aumento no crescimento celular.

As Figuras 1(a), 2(b) e 3(c) e As Equações 2, 3 e 4, mostram que a variável com maior efeito nas respostas: RM, TS, e IE foi a concentração de nitrato de amônio. Este fato mostra a importância da concentração de nitrogênio neste processo fermentativo.

De acordo com os valores obtidos na Tabela 1, verifica-se que as duas estirpes possuem um bom potencial para a produção de biosurfactante, pois todos os valores obtidos na redução da tensão superficial foram inferiores a 35 dina/cm. Sendo que a percentagem de redução da tensão superficial máxima foi de 57 % no experimento 7.

Segundo COOPER (1984), um organismo é considerado promissor produtor de biosurfactante quando produz compostos tensoativos com tensão superficial inferior a 40 dina/cm. Todavia, para um biosurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 dina/cm.

Apesar da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 apresentar maior crescimento celular, ela não apresentou melhores resultados em relação à RM, TS, e ao IE, conforme mostram os resultados apresentados na Tabela 1. Isso demonstra que a *Pseudomonas* ATCC 9027 provavelmente utilizou maior parte do substrato para seu crescimento celular e não para a produção do raminolipídeo.

Os resultados obtidos neste planejamento sugerem que a *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC apresenta, além de melhor capacidade degradativa do óleo de soja residual presente nos meios fermentados, maior potencial para produzir biosurfactante.

Analisando os experimentos ímpares, isto é, os ensaios com a *Pseudomonas* PALC selecionada, observou-se que comparando os pares experimentais 9 e 1, 11 e 3, 13 e 5 e 15 e 7 nos quais a concentração de óleo de soja residual foi aumentada, a concentração de raminose e o índice de emulsificação aumentaram e a tensão superficial diminuiu. Este comportamento está de acordo com a análise das Equações 2, 3 e 4 com os gráficos de Pareto, Figuras 1(a), 2(b) e 3(c). Além disso, no experimento 5, obteve-se maior produção de raminose (1,39 g/L), menor valor de tensão superficial (26 dina/cm) e um índice de emulsificação de 100%, utilizando-se os valores extremos de concentração de óleo de soja residual e de levedura cervejeira residual e mínima de nitrato de amônio. LANG e WULLBRANT (1999), afirmaram que para a obtenção de altas concentrações de raminose no meio de *Pseudomonas*

aeruginosa são necessárias altas concentrações de carbono e nitrogênio, isto é, excesso da fonte de carbono.

Entre os pares de experimentos mencionados anteriormente o que apresentou maior variação nas respostas estudadas foi o 1 e 9 (aumento de 102,9% na produção de raminose e 42,9% no índice de emulsificação e redução de 13% na tensão superficial), justamente quando foram empregadas as maiores concentrações de nitrato de amônio e de levedura cervejeira residual. Isso, demonstra a necessidade de se estudar uma faixa mais ampla de concentração de óleo de soja residual, visando a otimização desta variável no processo de produção de raminolipídeo.

Comparando os pares experimentais 3 e 1; 7 e 5; 9 e 11 e 15 e 13, verificou-se que aumentando a concentração de levedura cervejeira residual ocorreu um aumento na concentração de raminose, no índice de emulsificação e uma redução na tensão superficial. Este comportamento está de acordo com a análise das Equações 2, 3 e 4. Estes resultados apontam para a necessidade de ampliar a faixa de concentração de levedura cervejeira residual, objetivando a otimização desta variável no processo de produção de raminolipídeo.

Os resultados da Tabela 1 mostram que valores superiores a 0,69 g/L de raminose não tem efeito significativo na redução da tensão superficial. Isto provavelmente ocorre por ser alcançada a concentração micelar crítica. Por outro lado, os resultados mostram que valores de tensão muito próximos como 28,5 e 28,0 dina/cm (experimentos 14 e 15) ou iguais (experimentos 3 e 6) os índices de emulsificação são diferentes. Confirmando a hipótese de que não existe uma relação direta entre a redução da tensão superficial e o índice de emulsificação. Resultados semelhantes foram obtidos por KOSARIC, 1996. De fato, esta propriedade está relacionada com a estrutura da molécula, que por sua vez é afetada pelas condições nutricionais e ambientais.

3.1 Resultados da Extração e purificação de raminolipídeos

Tanto para a extração quanto para a purificação dos raminolipídeos as análises realizadas foram determinadas a partir do meio de cultivo proveniente da fermentação obtida da melhor condição experimental definida no planejamento experimental fatorial.

Na Tabela 2, encontram-se os resultados de produção de raminolipídeos, índice de emulsificação e tensão superficial obtidos da extração e purificação do meio fermentado após 48 horas de processo

Tabela 2 - Resultados de produção de raminolipídeos, índice de emulsificação e tensão superficial obtidos a partir da extração orgânica e coluna de adsorção do meio fermentado após 48 horas de processo.

Métodos Analíticos	RM (g/L)	TS (dina/cm)	IE (%)
Extração Orgânica	2,10±0,02	27,0±0,5	100±0
Coluna de Adsorção	2,50±0,01	27,0±0,5	100±0

Através da Tabela 2, observa-se que a extração de raminolípídeos através da coluna de adsorção (troca iônica) se mostrou mais adequada, resultando um aumento de 80 % na concentração de raminose (2,5 g/L) na solução após a extração em relação a concentração no caldo fermentado, enquanto que para a extração orgânica esse percentual foi de 51%, quando comparados, respectivamente, ao melhor resultado obtido no planejamento de experimento (1,39 g/L).

4 – CONCLUSÕES

A metodologia do planejamento experimental foi uma ferramenta muito útil para determinar o comportamento das variáveis independentes sobre a RM, TS, IE e X_F , evitando análises excessivas. A variável de maior influência nas respostas obtidas (RM, TS, IE e X_F), foi a concentração de nitrato de amônio. Dentro da faixa estudada, o aumento na concentração de óleo de soja residual e a redução da concentração de nitrato de amônio no meio fermentado, promovem o aumento na concentração de raminose e a redução na tensão superficial.

Ambas as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas têm a capacidade de produzir biosurfactante. Através da *Pseudomonas aeruginosa* PALC obteve-se os melhores resultados de raminose (1,39 g/L) e tensão superficial (26 dina/cm). A coluna de adsorção apresentou melhor resultado com maior concentração, na solução após extração, de tensoativos puros (2,5 g/L) do que o processo de extração orgânica (2,10 g/L).

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.
- BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; ROENE, R.; BANERJU, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.80-88, 1991.
- BANAT, I. M.; RHAMAN, K. S. M.; RHAMAN, T. J.; MARCHANT, R.; MCCLEAN, S. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, p. 283-288, 2002.
- BERTRAND, J. C.; BONIN, P.; GOUTX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE, G. The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environments. **Research in Microbiology**, v.145, n.1, p.53-56, 1994.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.520-529, 1998.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.1, p.4-10, 1979.
- COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental**, v.47, n.1, p.173-176, 1984.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, p.224-229, 1987.
- DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v.75, p.235-240, 2000.
- FOX, S. L.; BREHM, M. A.; ROBERTSON, E. P.; JACKSON, J. D.; THOMAS, C. P.; BALA, G. A. Comparative analysis of microbially mediated oil recovery by surfactants produced by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. In: Premuzic, E. T., Woodhead, A. (Eds.), **Developments in Petroleum Science**. Elsevier, New York, p. 143 - 150, 1993.
- FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. In: Anais do workshop sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal, **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, p.52-58, 1996.
- HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.88 p.379-387, 2000.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton, 1991.
- KOSARIC, N. Biosurfactantes. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology**, cap.17, p.659-717, 1996.
- LANG S, WULLBRANDT D. Rhamnolipids biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.22-32, 1999.
- LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* IF-2. **Biotechnology Program**, v 9, p.138-145, 1993.
- MITTELBAACH, M., TRITTHART, P. Diesel fuel derived from vegetable oils, III. Emission tests using methyl esters of used frying oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, n 7, p. 1185-1187, 1988.
- MORIKAW, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A Study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n.3, p.211-218, 2000.
- MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v.12, p.37-44, 1989.
- NITSCHKE, M.; e PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, p. 772-776, 2002.
- RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M.; THAHIRA-RAHAMAN, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v.81, p.25-32, 2002.
- REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H.; HIRT, R.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.51, n.5, p.985-989, 1986.
- ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Fermentation and Bio-industrial CBEM**, v.42, n.1, p.1-7, 1991.

- SANTA ANNA, L. M. SEBASTIAN, G. V., PEREIRA J. N., SANTOS A. S., MENEZES E. AND FREIRE D. M. G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environmental. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.
- SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P.; VASQUEZ, G. S.; SANTA ANNA, L. M.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of diferent carbon in nitrogen sources in production of rhamnolipis by a strain *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.100, n.1-3, p. 1025-1036, 2002.
- SHETTY, J. K.; KINSELLA, J. E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of the isolated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 30, n. 6, p. 1166-1171, 1982.