

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Mariana Amaral Azevedo

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE PAINÉIS FOTOVOLTAICOS: *SCREENING*,
OTIMIZAÇÃO E USO DE SUBSTRATO ALTERNATIVO**

Sorocaba

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Mariana Amaral Azevedo

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE PAINÉIS FOTOVOLTAICOS: *SCREENING*,
OTIMIZAÇÃO E USO DE SUBSTRATO ALTERNATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Iolanda Cristina Silveira Duarte

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Sorocaba

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Amaral Azevedo, realizada em 21/02/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Guilherme Pereira Vicente (FACENS)

Profa. Dra. Tayane de Cássia Dias Mendes Silva (UFPE)

Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Amaral Azevedo, Mariana

Avaliação da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos: screening, otimização e uso de substrato alternativo / Mariana Amaral Azevedo -- 2024. 69f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca Examinadora: Tayane de Cássia Dias Mendes Silva, João Guilherme Pereira Vicente

Bibliografia

1. Biossurfactante. 2. Design Experimental. 3. Melaço de soja. I. Amaral Azevedo, Mariana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram nesta trajetória de alguma forma.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Iolanda Cristina Silveira Duarte, por todos esses anos me orientando e me dando suporte.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada. Em especial à Letícia, Gabriela, Mateus e Vitor pelo apoio e ajuda durante os diversos testes.

Aos meus pais, avós e amigos por sempre me apoiarem em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – PPGBMA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

RESUMO

Biologicamente, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes e redutores de tensão superficial em setores industriais, farmacêuticos e alimentícios. Para diminuir os custos da produção, são utilizadas fontes de carbono alternativas, como os resíduos agroindustriais. O presente trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, isolados previamente de painéis fotovoltaicos; como também avaliar e otimizar a produção de biossurfactante utilizando melação de soja como substrato. O melação foi caracterizado e submetido a pré-tratamento para aumentar a quantidade de monossacarídeos acessíveis aos microrganismos. Para confirmar a síntese de biossurfactante pelos microrganismos foi utilizado como parâmetro a redução da tensão superficial, e posteriormente, foi feita a otimização da produção por delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}). As condições selecionadas foram o melação de soja diluído, sob temperatura de 50°C e rotação de 200 rpm, que resultaram no maior índice de emulsão e na maior redução de tensão superficial. Os biossurfactantes produzidos nos ensaios com *Psychrobacter* sp. e *Rhodotorula mucilaginosa* emulsionaram diferentes fontes hidrofóbicas - óleo de soja (93,77 e 84,03%), óleo de motor (80,67 e 67,99%), querosene (85,66 e 62,01%) e óleo diesel (95,30 e 88,19%); além de reduzir a tensão superficial (34,32 e 34,27 mN.m⁻¹), respectivamente para bactéria e levedura. Por fim, este trabalho visou a seleção de cepas produtoras de biossurfactante e a valorização da biomassa para a produção de moléculas de alto valor agregado.

Palavras-chave: Biossurfactante; Design Experimental; Melação de soja; Triagem; Tensão Superficial.

ABSTRACT

Biotechnologically, biosurfactants are used as emulsifiers and surface tension reducers in industrial, pharmaceutical and food sectors. To reduce production costs, alternative carbon sources are used, such as agro-industrial waste. The present work aimed to select microorganisms that produce biosurfactants, previously isolated from photovoltaic panels; as well as evaluating and optimizing the production of biosurfactant using soy molasses as a substrate. The molasses was characterized and subjected to pre-treatment to increase the amount of monosaccharides accessible to microorganisms. To confirm the synthesis of biosurfactant by microorganisms, the reduction in surface tension was used as a parameter, and subsequently, production was optimized using a fractional factorial design (2^{5-1}). The selected conditions were diluted soybean molasses, at a temperature of 50°C and rotation of 200 rpm, which resulted in the highest emulsion index and the greatest reduction in surface tension. The biosurfactants produced in tests with *Psychrobacter* sp. and *Rhodotorula mucilaginosa* emulsified different hydrophobic sources - soybean oil (93.77 and 84.03%), engine oil (80.67 and 67.99%), kerosene (85.66 and 62.01%) and diesel oil (95.30 and 88.19%); in addition to reducing surface tension (34.32 and 34.27 mN.m⁻¹), respectively for bacteria and yeast. Finally, this work aimed to select biosurfactant-producing strains and valorize biomass to produce molecules with high added value.

Keywords: Biosurfactant; Experimental Design; Soybean Molasses; Screening; Surface Tension.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Composição dos açúcares presentes no melão de soja diluído, melão com hidrólise ácido-diluída, clarificado e no resíduo de clarificação quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....36
- Figura 2.2 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de Soja: A) Rotação e temperatura; B) melão de soja e fonte hidrofóbica e C) temperatura e melão de soja para a bactéria *Psychrobacter* sp.....39
- Figura 2.3 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de motor: A) Rotação e temperatura; B) melão de soja e temperatura; C) melão de soja e rotação e D) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.....40
- Figura 2.4 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para querosene: A) temperatura e melão de soja; B) rotação e fonte hidrofóbica; C) melão de soja e rotação e D) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.....41
- Figura 2.5 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo diesel: A) temperatura e rotação; B) temperatura e melão de soja e C) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.....42
- Figura 2.6 - Gráfico de Contorno de tensão superficial (mN.m⁻¹): A) temperatura e rotação; B) rotação e melão de soja e C) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.....43
- Figura 2.7 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de Soja: A) Rotação e temperatura e B) melão de soja e rotação para a levedura *R. mucilaginosa*.....44
- Figura 2.8 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo diesel: A) Rotação e temperatura e B) melão de soja e fonte hidrofóbica para a levedura *R. mucilaginosa*.....44
- Figura 2.9 - Gráfico de Contorno de tensão superficial (mN.m⁻¹): A) temperatura e rotação; B) rotação e fonte hidrofóbica; C) melão de soja e rotação e D) fonte hidrofóbica e melão de soja para a *R. mucilaginosa*.....45

Figura 2.10 – Índice de emulsão (%E₂₄) em óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel; Rendimento e Tensão Superficial (mN.m⁻¹) comparando produção controle e otimizada para (A) *Psychrobacter* sp. e (B) *R. mucilaginosa*.....47

Figura 2.11 - Gráficos de monitoramento de crescimento microbiano, pH, tensão superficial e açúcares durante a fermentação para (A) *Psychrobacter* sp. e (B) *R. mucilaginosa*.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Variáveis independentes e níveis de variação do experimento fatorial completo.....	16
Tabela 1.2 – Variáveis e média dos dados de TS e Índice de Emulsão.....	19
Tabela 1.3 – <i>p</i> -valor e <i>f</i> -valor do efeito das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de BS.....	21
Tabela 2.1 – Parâmetros utilizados para a caracterização físico-química do melaço de soja.....	30
Tabela 2.2 – Variáveis independentes e níveis de variação.....	33
Tabela 2.3 – Dados comparativos da composição (% e g.L ⁻¹) do melaço de soja diluído, clarificado, hidrolisado e do resíduo de clarificação.....	35
Tabela 2.4 – Valor- <i>p</i> e valor- <i>f</i> dos efeitos das variáveis independentes – temperatura, rotação, fonte hidrofóbica, suplementação química e tipo de melaço de soja – nas variáveis dependentes – tensão superficial e emulsão – avaliadas para a produção de BS por <i>Psychrobacter</i> sp.....	37
Tabela 2.5 – Valor- <i>p</i> e valor- <i>f</i> dos efeitos das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de BS por <i>R. mucilaginosa</i>	38
Tabela 1 – Parâmetros utilizados na otimização e índice de emulsão (%E ₂₄) e tensão superficial (mN.m ⁻¹) para a bactéria <i>Psychrobacter</i> sp.....	62
Tabela 2 – Parâmetros utilizados na otimização e índice de emulsão (%E ₂₄) e tensão superficial (mN.m ⁻¹) para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 ARTIGO 1	13
2.1 Introdução.....	14
2.3 Metodologia	16
2.4 Resultados E Discussão	19
2.5 Conclusões	22
Referências.....	23
3 ARTIGO 2	27
3.1 Introdução.....	28
3.3 Metodologia.....	30
3.4 Resultados E Discussão	35
3.5 Conclusões.....	50
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE – A	62

1 INTRODUÇÃO

Brasil, Estados Unidos e Argentina são os maiores produtores de soja do mundo (Valdes *et al.*, 2023). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023), o Brasil gerou, na safra de 2022/23, 154,6 milhões de toneladas por ano, aproximadamente. O melaço de soja é um subproduto do concentrado proteico de soja produzido por extração alcoólica, composto por carboidratos solúveis, proteínas, lipídios e cinzas (Loman & Ju, 2016; Cheng *et al.*, 2017). A cada 600 toneladas de concentrado de soja produzidas são geradas 200 toneladas de melaço (Siqueira *et al.*, 2008). Por conta dessa quantidade de melaço, foi proposto a sua utilização como fonte de carbono no cultivo microbiano (Oliveira *et al.*, 2020).

Diferentes autores investigaram o uso do melaço como substrato de baixo custo para a produção de metabólitos secundários com alto valor comercial (Zhang *et al.*, 2009; Al-Bahry *et al.*, 2013; Vrieze *et al.*, 2015). Os metabólitos primários e secundários produzidos pelos microrganismos são fundamentais em processos biotecnológicos. Metabólitos primários são sintetizados ininterruptamente durante o crescimento do microrganismo, pois são essenciais para garantir a sobrevivência e processos celulares, como crescimento e reprodução. Um exemplo disso são os fosfolipídios e glicolipídios, biossurfactantes presentes na membrana celular que formam na bicamada lipídica uma conformação micelar (Kosaric & Sukan, 2014; Vieira *et al.*, 2021)

No entanto, metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento do organismo, mas fornecem vantagens adaptativas. Por serem não essenciais são produzidos na fase estacionária da curva de crescimento, quando os substratos são esgotados ou quando submetidos a alguma condição de estresse. Entre os metabólitos secundários estão antibióticos, pigmentos, toxinas, inibidores enzimáticos e biossurfactantes (Fouillaud & Dufossé, 2022).

Os biossurfactantes são moléculas de natureza anfifílica por conterem, ao mesmo tempo, um grupo hidrofílico e um hidrofóbico. As principais características são a redução da tensão superficial (Akbari *et al.*, 2018), formação de emulsões estáveis, alta biodegradabilidade, alteração da molhabilidade em uma superfície sólida e baixa toxicidade (Panjiar *et al.*, 2020; Sharma & Pandey, 2020; Datta *et al.*, 2020).

Concomitantemente, os surfactantes sintéticos ocasionam espumas superficiais em corpos hídricos, o que pode influenciar os componentes bióticos e abióticos do meio. Além disso, podem penetrar na membrana celular e ocasionar uma reação tóxica, inflamatória e estresse oxidativo. Um exemplo desses danos ocorre em peixes, que ao acumularem essas

moléculas no organismo, tem como consequência a perda de visão e danos as guelras, além da desregulação endócrina (Sobrino-Figueroa *et al.*, 2018; Arora *et al.*, 2022).

Devido a esses atributos, os biossurfactantes tornam-se uma alternativa aos surfactantes sintéticos e são de interesse para aplicações em diversos setores industriais, como na área agrícola, farmacêutica, na indústria de cosméticos e para processos de biorremediação (Ashish & Das *et al.*, 2018). Os biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos. No entanto, microrganismos isolados de ambientes extremos podem produzir biossurfactantes de interesses biotecnológicos distintos. Ambientes extremos não estão restritos somente à ambientes naturais, mas também artificiais, como os painéis fotovoltaicos (Moura *et al.*, 2021).

Os microrganismos isolados da superfície dos painéis fotovoltaicos são, em sua maioria, pigmentados e, com resistência à radiação e dessecação (Tanner *et al.*, 2018). Essas características estão relacionadas com a superação do estresse oxidativo dos microrganismos perante à irradiação e à dessecação, tornando-os atrativos para aplicações biotecnológicas (Qi *et al.*, 2020).

Dentre os microrganismos isolados de painéis solares, destacam-se neste trabalho alguns gêneros já reportados na literatura como produtores de biossurfactantes (Qi *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2022; Zargar *et al.*, 2022), como espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula* capazes de crescer em ambientes acidófilos, com pH de 1,5, em condições de estresse oxidativo, temperaturas extremas e altas salinidade (Johnson, 2013; Tkavc *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2019; Chaves *et al.*, 2021; Loeto *et al.*, 2021). Também abordam-se espécies de bactérias do gênero *Kocuria*, *Psychrobacter* e *Gordonia* que possuem representantes extremófilos como alcalófilos, halotolerantes, resistentes à radiação UV-C e dessecação (Sarafin *et al.*, 2014) e ao estresse oxidativo (Bottos *et al.*, 2020; De Lemos *et al.*, 2023).

Dessa forma, o presente estudo visou avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos e otimizar a produção utilizando do melão de soja como fonte de carbono. O presente trabalho é dividido dois capítulos, sendo o primeiro o Artigo 1 “**Triagem de cepas bacterianas isoladas de painéis fotovoltaicos para a produção de biossurfactante**” e o segundo, Artigo 2 “**Produção e otimização de biossurfactante por *Rhodotorula mucilaginosa* e *Psychrobacter* sp. utilizando melão de soja como fonte de carbono**”

2 ARTIGO 1

Triagem de cepas bacterianas isoladas de painéis fotovoltaicos para a produção de biossurfactante

Resumo

Microrganismos extremófilos se adaptam para sobreviver em ambientes em que as propriedades físico-químicas são hostis à maioria dos organismos vivos. A presença de extremófilos, entretanto, não se restringe a ambientes naturais, pois eles também podem colonizar ambientes artificiais como painéis fotovoltaicos. Devido à resistência à radiação e dessecação, esses microrganismos costumam sintetizar metabólitos de interesse biotecnológico, como pigmentos e biossurfactantes. Portanto, foi avaliada a capacidade de produzir biossurfactantes por três espécies: *Gordonia* sp., *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp.. A determinação da cepa mais eficiente na produção de biossurfactante foi feita a partir de um planejamento de experimentos (DOE), adotando como fatores: cepas, tempo de cultivo e meio de cultura. Como variáveis resposta foi utilizado o índice de emulsão (%E₂₄) e a capacidade de reduzir a tensão superficial (TS). A análise de variância (ANOVA) com ajuste de Tukey foi aplicada para verificar a existência de diferença significativa ($p < 0,05$), entre as tensões superfícies (TS) e emulsões. A partir dos resultados, foi obtida a condição otimizada para a produção de biossurfactante utilizando a cepa *Psychrobacter* sp., em meio Bushnell-Hass por 168h; em que foi possível alcançar 90,66% da emulsão e reduzir a TS de 72 mN.m⁻¹ para 38,44 mN.m⁻¹. Os ensaios possibilitaram a escolha de microrganismos promissores na produção de biossurfactante.

Palavras-Chave: Extremófilos; Biossurfactante; Emulsificante; Otimização

2.1 INTRODUÇÃO

Os extremófilos são microrganismos que conseguem sobreviver em ambientes cujas propriedades físico-químicas são limitantes (Basak *et al.*, 2020). Eles podem ser classificados como tal quando condições extremas são necessárias para permitir seu crescimento, ou extremo-tolerantes quando são capazes de tolerar condições ambientais adversas, mas seu crescimento ideal ocorre em condições mais amenas (Salwan & Sharma, 2020). Esses microrganismos são denominados de acordo com as condições para as quais estão adaptados para sobreviver ou tolerar, sendo classificados, por exemplo, como termófilos, psicrófilos, halófilos e acidófilos (Azevedo *et al.*, 2023).

A presença de termófilos não se restringe a ambientes naturais, mas também podem ser encontrados em ambientes artificiais, como os painéis fotovoltaicos (Moura *et al.*, 2021). Tanner *et al.* (2019) relataram que os microrganismos presentes nos painéis são pigmentados e resistentes à radiação e dessecação, o que torna seus metabólitos interessantes do ponto de vista biotecnológico. As moléculas produzidas por esses microrganismos apresentam propriedades únicas e maior estabilidade quando comparadas às moléculas sintetizadas por microrganismos mesófilos (Ibrahim, 2018; Salwan & Sharma, 2020). Moura *et al.* (2021) investigaram a diversidade microbiológica de painéis fotovoltaicos e encontraram genes de degradação de hidrocarbonetos. Dentre as cepas encontradas, microrganismos dos gêneros *Gordonia*, *Kocuria* e *Psychrobacter* foram selecionados para estudo de produção de biossurfactantes.

Os biossurfactantes são moléculas tensoativas e emulsificantes, que possuem ampla aplicabilidade e são sintetizadas por diferentes organismos vivos, como fungos, leveduras e bactérias; o que implica, em uma elevada diversidade de estruturas, conformações e composições (Manga *et al.* 2021). Apesar dessas distinções, todos os biossurfactantes são caracterizados por possuírem um grupo hidrofóbico e um hidrofílico, permitindo sua solubilização tanto em solventes polares, como em apolares. Devido a essa natureza, os biossurfactantes são chamados anfifílicos.

Ao contrário dos surfactantes sintéticos, geralmente categorizados devido à sua polaridade, os biossurfactantes podem ser classificados em termos de produção microbiana, composição química, estrutura molecular e peso molecular (Sarubbo *et al.*, 2022).

Em sistemas naturais, a produção de surfactante microbiano é um sinal de adaptação, uma vez que está associada a funções fisiológicas, como a formação de biofilme, *quorum sensing*, diferenciação celular e proteção contra elementos tóxicos ou outros microrganismos (Van Hamme *et al.*, 2006). Além disso, esses compostos favorecem os processos de obtenção

de nutrientes e auxiliam na solubilização de substratos hidrofóbicos, aumentando a disponibilidade dos substratos, a hidrofobicidade da célula e auxiliando na sobrevivência nesses ambientes (Shah *et al.* 2016; Ibrahim *et al.*, 2018).

Além de apresentarem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Schultz & Rosado, 2019), os biossurfactantes apresentam importantes propriedades, tais como redução da tensão superficial, molhabilidade, emulsificação, dispersão e agregação de sólidos. Essas características podem ser vantajosas em aplicações industriais, médicas e processos ambientais (Drakontis & Amin, 2020); o que justifica a ampla aplicabilidade dessas moléculas.

Quando obtidos de bactérias, os biossurfactantes são usualmente produzidos durante a fase estacionária de crescimento (Shah *et al.*, 2016) e podem ser encontrados aderidos à membrana celular ou secretados nos meios de cultura como metabólitos secundários (Vieira *et al.*, 2021). O gênero *Gordonia* possui alta adaptabilidade, podendo apresentar diferentes características a partir de condições ambientais diversas (Silva *et al.*, 2022). Além disso, estudos comprovaram a capacidade de produção tensoativa por essa bactéria e sua natureza glicolípídica (Qi *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2022; Zargar *et al.*, 2022). Espécies do gênero *Psychrobacter* estão presentes, predominantemente, em ambientes de baixa temperatura, mas também podem ser isoladas de animais, alimentos e guano (Bowman, 2006; Lasek *et al.*, 2017). Esse gênero já apresentou capacidade de produção de bioemulsificantes, que foram caracterizados como glicolípídios (Trudgeon *et al.*, 2020; Riccardi *et al.*, 2022). Ainda, a produção de biossurfactante de natureza lipopeptídica por espécies do gênero *Kocuria* já foi reportada em diferentes estudos (Dubey *et al.*, 2012; Sarafin *et al.*, 2014; Karnwal, 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a produção de biossurfactantes pelas cepas *Kocuria* sp., *Gordonia* sp. e *Psychrobacter* sp., isoladas de painéis fotovoltaicos; bem como a otimização da produção de biossurfactantes considerando a cepa, o tempo e o meio de cultivo.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1. Ensaios de Produção de Biossurfactantes

2.3.1.2. Seleção de Cepa Bacteriana

As bactérias, *Kocuria* sp., *Psychrobacter* sp. e *Gordonia* sp., foram isoladas previamente de painéis fotovoltaicos de Itatiba (-22°59'36.3", -46°50'48") – PSI – e Sorocaba (-23°28'55", -47°22'19.9") – PSR – durante o inverno. Dados climatológicos de junho de 2020 – ano de coleta das amostras – registrados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) indicaram que a temperatura estava próxima a 19°C, com umidade relativa de 72%, para ambas as cidades. Com relação a radiação solar, em Itatiba, estava a 267 W/m² e em Sorocaba estava a 311,5 W/m², os níveis de precipitação a 0,1 mm e 0,05 mm, respectivamente. Além disso, a temperatura do painel era de 21°C para o PSI e 43°C para PSR. Por fim, com relação a limpeza e instalação, o painel de Itatiba foi instalado um ano antes da coleta e limpo seis meses antes; enquanto que o de Sorocaba fora instalado há dois anos antes da retirada da amostra e nunca fora limpo (Moura *et al.*, 2021).

Posteriormente, foi elaborada uma triagem a partir de um planejamento de experimentos (DOE) considerando-se as cepas, tempo e meio de cultura como fatores (Tabela 1.1); enquanto como respostas avaliou-se o índice de emulsão e a capacidade de reduzir a tensão superficial. Para isso, foi elaborado um experimento fatorial completo totalizando 54 ensaios. Os resultados foram analisados a partir de Análise de Variância (ANOVA), utilizando o software Minitab 19 e adotando o intervalo de confiança de 95%. Os dados foram utilizados na ferramenta de otimização de respostas visando determinar as condições que possibilitaram a maior emulsão e a maior redução de tensão superficial. Para isso, foi utilizado o método *Desirability*, que determina a melhor condição do processo dentre as diversas respostas, considerando como 0 uma resposta indesejável e 1 a resposta ideal (Candiotti, 2014).

Tabela 1.1 – Variáveis independentes e níveis de variação do experimento fatorial completo

Variáveis	Níveis de Variação		
Tempo (h)	72	120	168
Cepas	<i>Kocuria</i> sp. PSR 72 (1)	<i>Psychrobacter</i> sp. PSI 68 (2)	<i>Gordonia</i> sp. PSR 46 (3)
Meio de Cultura	Bushnell-Haas (M1) ¹	M9 - Minimal Salts (M2) ²	McKeen (M3) ³

¹(Ibrahim *et al.*, 2013); ²(Trudgeon *et al.*, 2020); ³(Dhagat & Jujjavarapu, 2021)

Fonte: Elaborado pela autora.

2.3.3.2. Padronização do Inóculo

As cepas bacterianas foram cultivadas em Ágar Triptona de Soja (TSA) por 48h. Com alça calibrada de 10 μL , transferiu-se a colônia para 10 mL de Caldo Nutriente (Hudson *et al.*, 1987), mantido em frasco Erlenmeyer. O inóculo permaneceu por 24 h a 30°C sob agitação de 120 rpm em incubadora com agitação orbital. Em seguida, centrifugou-se a 7197 g para obter-se a biomassa microbiana, que foi ressuspensa em solução salina estéril (0,9% de NaCl) para padronização do inóculo. A absorbância foi medida e ajustada para 1 a 600 nm, correspondendo a $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC).mL⁻¹. Os ensaios de produção de biossurfactante foram inoculados com 10% dessa suspensão (Marcelino *et al.*, 2019).

2.3.3.3. Meio de Cultura

Os meios de cultura testados para produção de biossurfactante foram (1) Bushnell-Haas, seguindo a metodologia de Ibrahim *et al.* (2013), contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: 2,2 de Na₂HPO₄; 0,01 de FeSO₄ . 7H₂O; 0,05 de NaCl; 1,4 de K₂HPO₄; 0,02 de CaCl₂ e 0,6 de MgSO₄ .7H₂O, e suplementado com 5 mL da solução estoque contendo em g.L⁻¹: 0,56 de H₃BO₃; 0,42 de CoCl₂ . 6H₂O; 1,0 de CuSO₄ . 5H₂O; 1,78 de MnSO₄ . 4H₂O; 0,39 de Na₂MoO₄ . 2H₂O; 2,32 de ZnSO₄ . 7H₂O; 1,0 de EDTA; 0,004 de NiCl₂ . 6H₂O e 0,66 KI. (2) M9 Minimal Salts (Trudgeon *et al.*, 2020) constituído de (g.L⁻¹): 64 de Na₂HPO₄ . 7H₂O; 15 de KH₂PO₄; 2,5 de NaCl; 5 de NH₄Cl e 2% de óleo de soja estéril. (3) meio McKeen (Dhagat & Jujjavarapu, 2021) composto de, em g.L⁻¹: 10 de C₅H₈NO₄Na; 1 de MgSO₄ .7H₂O; 1 de K₂HPO₄; 0,5 de KCl; 3 de extrato de levedura; 10 de glicerol e suplementado com 1 mL da solução traço contendo (g.L⁻¹): 5 de MgSO₄ .7H₂O; 1,6 de CuSO₄ . 5H₂O; 0,15 de FeSO₄ . 7H₂O.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL com 75 mL de meio reacional e mantidos em incubadora orbital sob agitação de 200 rpm e temperatura estabilizada em 30°C (Hudson *et al.*, 1987). O meio de cultivo foi centrifugado a 7197 g, 4°C por 20 min para obtenção do sobrenadante (Das & Kumar, 2018).

2.3.3.4. Tensão Superficial

A tensão superficial foi analisada com o biossurfactante extraído (Pruthi & Cameotra, 2003), em medidor de ângulo de contato modelo Ramé-Hart 250 standard. A gota suspensa foi fotografada com auxílio do *software DROPimage Advanced* e a tensão foi mensurada através do *software ImageJ* pelo plugin *Pendent_Drop* (Daerr & Mogné, 2016).

2.3.3.5. Índice de Emulsão

Na análise do índice de emulsão, o óleo de soja foi utilizado como fonte hidrofóbica. Em tubo de ensaio de 10 mL foram adicionados 3 mL da fonte hidrofóbica e 3 mL do sobrenadante. O tubo foi agitado por 2 minutos em vórtex e deixado em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. O índice de emulsão foi calculado pela razão entre a espessura da camada emulsionada e a altura total (Cooper & Goldenberg, 1987).

2.3.3.6. Análise dos Resultados

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados analisados por ANOVA ($p > 0,05$) usando o Software Minitab 19. Os erros padrão para os valores médios, com nível de confiança de 95%, serão calculados e apresentados como barras de erro-padrão em todas as representações gráficas.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maiores índices de emulsão foram obtidos com 72h para os ensaios com *Kocuria* sp. e *Gordonia* sp., atingindo, aproximadamente, 73% de emulsão em meio M3 (Tabela 1.2). O índice de emulsão com *Psychrobacter* sp. foi de 76% também em meio M3, porém com 120h, além de atingir 90% em 168h utilizando o meio M1. Com relação a tensão superficial, os menores valores atingidos foram nos ensaios com *Gordonia* sp., com redução da TS para 41,31 mN.m⁻¹ no meio M2 com 120h; como também nos ensaios com *Psychrobacter* sp., em que a TS foi de 38,44 mN.m⁻¹ e 46,56 mN.m⁻¹, utilizando os meios M1 e M2, respectivamente, em 168h (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Variáveis e média dos dados de TS e Índice de Emulsão

Meio	Tempo	Cepas	TS média (mN.m ⁻¹)		Emulsão Média (%E ₂₄)	
M1	72h	<i>Kocuria</i> sp.	67,92	± 0,25	49,07	± 1,31
M2	72h	<i>Kocuria</i> sp.	62,73	± 4,98	16,22	± 4,49
M3	72h	<i>Kocuria</i> sp.	64,43	± 1,29	73,29	± 7,14
M1	72h	<i>Psychrobacter</i> sp.	69,45	± 2,69	17,63	± 5,41
M2	72h	<i>Psychrobacter</i> sp.	67,41	± 3,02	21,53	± 3,61
M3	72h	<i>Psychrobacter</i> sp.	55,19	± 12,82	63,03	± 0,97
M1	72h	<i>Gordonia</i> sp.	65,41	± 1,10	18,31	± 0,18
M2	72h	<i>Gordonia</i> sp.	65,78	± 6,84	17,23	± 7,39
M3	72h	<i>Gordonia</i> sp.	68,13	± 1,07	73,35	± 7,65
M1	120h	<i>Kocuria</i> sp.	68,17	± 2,54	18,25	± 5,15
M2	120h	<i>Kocuria</i> sp.	58,67	± 13,00	13,29	± 0,30
M3	120h	<i>Kocuria</i> sp.	70,03	± 0,64	62,07	± 8,06
M1	120h	<i>Psychrobacter</i> sp.	69,05	± 0,74	30,56	± 2,16
M2	120h	<i>Psychrobacter</i> sp.	65,03	± 2,55	13,39	± 4,64
M3	120h	<i>Psychrobacter</i> sp.	71,01	± 0,93	76,85	± 2,13
M1	120h	<i>Gordonia</i> sp.	68,22	± 0,10	41,44	± 8,74
M2	120h	<i>Gordonia</i> sp.	41,31	± 1,12	8,79	± 1,94
M3	120h	<i>Gordonia</i> sp.	63,72	± 7,57	17,90	± 2,46
M1	168h	<i>Kocuria</i> sp.	70,10	± 0,63	59,59	± 14,80
M2	168h	<i>Kocuria</i> sp.	66,47	± 0,47	19,01	± 3,09
M3	168h	<i>Kocuria</i> sp.	61,95	± 4,84	70,98	± 0,64
M1	168h	<i>Psychrobacter</i> sp.	38,44	± 0,42	90,66	± 0,35
M2	168h	<i>Psychrobacter</i> sp.	46,56	± 4,52	16,04	± 7,33
M3	168h	<i>Psychrobacter</i> sp.	66,90	± 0,28	33,95	± 3,78
M1	168h	<i>Gordonia</i> sp.	65,87	± 5,46	33,63	± 11,14
M2	168h	<i>Gordonia</i> sp.	63,32	± 2,39	17,03	± 1,95
M3	168h	<i>Gordonia</i> sp.	52,95	± 2,54	14,36	± 3,94

M1: Bushnell-Haas M2: M9 - Minimal Salts M3: McKeen

Fonte: Elaborado pela autora

São inúmeros os fatores que influenciam na síntese dos biossurfactantes como temperatura, rotação, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e elementos traços, além da presença de oxigênio e pH (Aslam *et al.*, 2023). Dessa forma, as variáveis selecionadas são interessantes de serem analisadas devido a sua importância na triagem da produção desse metabólito.

No presente estudo, o biossurfactante produzido por *Psychrobacter* sp. emulsionou em 90% o óleo de soja, além de reduzir a tensão superficial de 72 mN.m⁻¹ para 38,44 mN.m⁻¹, em meio M1 – com 168 horas de incubação. São poucos os trabalhos publicados sobre a produção de biossurfactantes por este microrganismo. Trudgeon *et al.* (2020) utilizaram uma cepa *Psychrobacter* (PL 19) isolada da Antártica, que atingiu um índice de emulsão de 58,3% e o biossurfactante foi identificado como soforolipídio, em meio M9 após 10 dias. No estudo de Saisa-Ard *et al.* (2014), foi identificada uma redução de tensão superficial para 29,5 mN.m⁻¹, em meio com composição mínima de sais (MSM) em 168 horas. É possível notar que os resultados deste trabalho, para esta cepa, foram superiores quando comparados aos de emulsão e inferiores aos de tensão.

É válido ressaltar que ainda há uma lacuna de trabalhos relacionados aos gêneros *Psychrobacter*, *Kocuria* e *Gordonia* e que os únicos estudos encontrados estão aqui descritos.

Para *Gordonia* sp., a maior emulsão obtida foi de 73,35% em meio M3 com 72h de incubação. Enquanto que, a redução da tensão superficial para 41,31 mN.m⁻¹ ocorreu no ensaio em meio M2 com 120 horas. Zargar *et al.* (2022) analisou a produção de biossurfactante por *Gordonia* sp., em que obteve a emulsão de 47,9% e reduziu a tensão superficial para 36,82 mN.m⁻¹, em 168h de cultivo em caldo Luria Bertani. Silva *et al.* (2014) reportaram a produção de bioemulsificante por *Gordonia alkanivorans* com emulsão de 83,45% em benzeno e reduziu a tensão superficial para 35,63 mN.m⁻¹, em 72h em meio mineral livre de enxofre (SFM). Neste estudo, os resultados para *Gordonia* sp. foram similares, para a emulsão, aos de Silva *et al.* (2014) enquanto que, os resultados tensão foram similares aos de Zargar *et al.* (2022).

Segundo Cooper (1986), uma cultura produz um biossurfactante promissor se reduzir a tensão superficial da água para 40 mN.m⁻¹ ou menos. Tendo isso em vista, os ensaios com a cepa *Kocuria* sp. atingiram valores de tensão acima do promissor. Enquanto que, para as emulsões são satisfatórias aquelas que permanecem com, no mínimo, 50% após 24h (Willumsen & Karlson, 1996). Dessa forma, os resultados foram satisfatórios apenas quando analisadas as emulsões. Os maiores índices foram atingidos em meio M3

quando incubados por 72h e 168h obtendo-se 73% e 71% de emulsão em óleo de soja, respectivamente.

Sarafin *et al.* (2014) isolou a cepa *Kocuria marina* (BS-15) que cresceu em caldo nutriente durante 24h e foi capaz de emulsionar petróleo em, aproximadamente, 50%. *Kocuria rosea* (ABR6) foi isolada por Akbari *et al.* (2021) e produziu biossurfactante em meio mineral por 10 dias, a tensão foi reduzida para 31,6 mN.m⁻¹ e atingiu 83% de emulsão em petróleo.

Os ensaios foram analisados estatisticamente e estão representados na tabela 1.3. Observaram-se os resultados dos efeitos significativos (*p*-valor) das variáveis – cepas, tempo e meio – junto ao coeficiente de determinação (R²) e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta aos valores de tensão superficial e emulsão. As variáveis isoladas e suas interações foram significativas no aumento da emulsão e redução da TS e o modelo estimou a *desirability* composta de 0,72, considerada satisfatória.

Tabela 1.3 – *p*-valor e *f*-valor do efeito das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de BS

Efeito	Óleo de Soja (%E ₂₄)		Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	
	p-valor	f-valor	p-valor	f-valor
	x ₁	< 0,005	23,22	0,007
x ₂	< 0,005	13,60	< 0,005	8,46
x ₃	< 0,005	21,60	0,014	5,2
x ₁ *x ₂	0,005	4,74	< 0,005	6,18
x ₁ *x ₃	< 0,005	12,53	0,048	2,78
x ₂ *x ₃	0,023	3,39	< 0,005	10,21
x ₁ *x ₂ *x ₃	0,097	1,93	< 0,005	7,66
R ²	0,8921		0,8726	

x₁ = Meio, x₂ = Tempo, x₃ = Cepas

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da ferramenta de otimização de respostas, foram estabelecidas as condições para obtenção da resposta máxima de emulsão e o mínimo de resposta de tensão superficial.

Dessa forma, o modelo otimizado selecionado foi com o cultivo da cepa *Psychrobacter* sp. em meio Bushnell-Haas – M1 – durante 168h de incubação. O índice de emulsão e a tensão superficial obtidas no ensaio realizado foram de 90,66% em óleo de soja e tensão superficial reduzida para 38,44 mN.m⁻¹.

Biossurfactantes são sintetizados utilizando metais como suplemento, tais quais Cálcio, Magnésio, Ferro e metais traço (Aslam *et al.*, 2023). Dessa forma, é provável que o ensaio com meio Bushnell-Haas – M1 – tenha obtido melhor desempenho devido a sua quantidade de elementos traço e de metais. Com relação ao tempo de incubação selecionado, é possível notar que conforme a progressão do tempo, a emulsão aumentou e a tensão superficial reduziu. Estudos que utilizaram o tempo como variável obtiveram resultados similares.

John *et al.* (2021) utilizando a cepa *Lysinibacillus fusiforme* onde mediram o índice de emulsão e a tensão ao longo do tempo, obtendo seu último resultado em 120 h, com 68,1% de emulsão e 36 mN.m⁻¹ de tensão superficial. Marajan *et al.* (2018) incubaram uma espécie de *Bacillus* por até 96 h e a tensão superficial foi reduzida para 32 mN.m⁻¹.

2.5 CONCLUSÕES

As cepas isoladas de painel solar foram capazes de produzir biossurfactante em meios de cultura e tempos específicos. O maior índice de emulsão (90,66%) e redução de tensão superficial (38,44 mN.m⁻¹) ocorreu nos ensaios com a cepa *Psychrobacter* sp. em meio Bushnell-Haas, após 7 dias de incubação a 30°C e agitação de 200 rpm.

REFERÊNCIAS

- ASLAM, Ruby et al. Biosurfactants: types, sources, and production. In: **Advancements in Biosurfactants Research**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 3-24.
- AKBARI, E. *et al.* A novel biosurfactant producing *Kocuria rosea* ABR6 as potential strain in oil sludge recovery and lubrication. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021. DOI: doi.org/10.1186/s13568-021-01283-9
- AZEVEDO, M. A. *et al.* Production of Biosurfactant by Bacteria from Extreme Environments: Biotechnological Potential and Applications. In: **Multifunctional Microbial Biosurfactants**. Springer Nature Switzerland, 2023.
- BASAK, P. *et al.* Exploration of extremophiles genomes through gene study for hidden biotechnological and future potential. **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**, , p. 315–325, 2020. DOI 10.1016/b978-0-12-818322-9.00024-1.
- BOWMAN, J. P. The genus *Psychrobacter*. In: **The Prokaryotes**. Springer, 2003. DOI doi.org/10.1007/0-387-30746-X_35.
- CANDIOTI, Luciana Vera et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014. DOI doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034.
- COOPER, David G. Biosurfactants. **Microbiological sciences**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987. DOI 10.1128/aem.53.2.224-229.1987.
- DAERR, A.; MOGNE, A. Pendent_Drop: An ImageJ Plugin to Measure the Surface Tension from an Image of a Pendent Drop. **Journal of Open Research Software**, v. 4, n. 1, p. 3, 2016. DOI 10.5334/jors.97.
- DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 233–240, 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.03.093.
- DHAGAT, S.; JUJJAVARAPU, S. E. Green synthesis of bioemulsifier and exopolysaccharides by *Brevibacillus borstelensis* and process parameters optimization using response surface model, genetic algorithm and NSGA. **Journal of Environmental Management**, v. 291, p. 112667, 2021. DOI 10.1016/j.jenvman.2021.112667.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77–90, 2020. DOI 10.1016/j.cocis.2020.03.013.
- DUBEY, K. V. *et al.* Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme

environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368–374, 2012. DOI 10.1016/j.biortech.2012.05.024.

HUDSON, M. J. *et al.* Relationship of CDC group EO-2 and *Psychrobacter immobilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1907–1910, 1987. DOI 10.1128/jcm.25.10.1907-1910.1987.

IBRAHIM, H. M. M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 27, n. 1, p. 21–29, 2018. DOI 10.1016/j.ejpe.2016.12.005.

IBRAHIM, M. L. *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28–34, 2013. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.11.012.

JOHN, Walter Chinaka *et al.* Evaluation of biosurfactant production potential of *Lysinibacillus fusiformis* MK559526 isolated from automobile-mechanic-workshop soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 663-674, 2021.

KARNWAL, A. Biosurfactant production by *Kocuria rosea* and *Arthrobacter luteolus* using sugar cane waste as substrate. **II Ponte International Scientific Researchs Journal**, v. 73, n. 2, 2017. DOI 10.21506/j.ponte.2017.2.33

LASEK, R. *et al.* Genome content, metabolic pathways and biotechnological potential of the psychrophilic Arctic bacterium *Psychrobacter* sp. DAB_AL43B, a source and a host of novel *Psychrobacter*-specific vectors. **Journal of Biotechnology**, v. 263, p. 64–74, 2017. DOI 10.1016/j.jbiotec.2017.09.011.

MANGA, E. B. *et al.* Biosurfactants: Opportunities for the development of a sustainable future. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 56, p. 101514, Dec. 2021. DOI 10.1016/j.cocis.2021.101514.

MARAJAN, C. *et al.* The effect of incubation time, temperature and pH variations on the surface tension of biosurfactant produced by *Bacillus* spp. In: **AIP conference proceedings**. AIP Publishing, 2018.

MARCELINO, P. R. F. *et al.* production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 212–223, 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.12.001.

MOURA, J. B. *et al.* Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 2021. DOI 10.1093/femsle/fnab105.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, n. 1, p. 65–68, 2003. DOI 10.1007/s11743-003-0250-9.

QI, P. *et al.* Demulsification and bio-souring control of alkaline-surfactant-polymer flooding produced water by *Gordonia* sp. TD-4. **Separation and Purification Technology**, v. 263, p. 118359, May 2021. DOI 10.1016/j.seppur.2021.118359.

QI, P. *et al.* Enhanced separation of emulsified oil from alkaline-surfactant-polymer flooding produced water by *Gordonia* sp. TD-4: From interactions to mitigation strategies and bio-demulsifying mechanisms. **Journal of Cleaner Production**, v. 337, p. 130538, 2022. DOI 10.1016/j.jclepro.2022.130538.

RICCARDI, C. *et al.* Genome analysis of a new biosurfactants source: The Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. TAE2020. **Marine Genomics**, v. 61, p. 100922, 2022. DOI 10.1016/j.margen.2021.100922.

SAISA-ARD, K. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. **Songklanakar Journal of Science and Technology**, v. 36, n. 2, 2014.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Overview of extremophiles. In: **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**. Academic Press, 2020.

SARAFIN, Y. *et al.* *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2014. DOI 10.1016/j.sjbs.2014.01.001.

SARUBBO, L. A. *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, 2022. DOI 10.1016/j.bej.2022.108377.

SCHULTZ, J.; ROSADO, A. S. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. **Extremophiles**, v. 24, n. 2, p. 189–206, 2019. DOI 10.1007/s00792-019-01151-2.

SHAH, N. *et al.* Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 5, 2016. DOI 10.5958/2394-5478.2016.00002.9.

SILVA, T. P. *et al.* A New Biosurfactant/Bioemulsifier from *Gordonia alkanivorans* Strain 1B: Production and Characterization. **Processes**, v. 10, n. 5, p. 845, 2022. DOI 10.3390/pr10050845.

TANNER, K. *et al.* Bioprospecting the Solar Panel Microbiome: High-Throughput Screening for Antioxidant Bacteria in a *Caenorhabditis elegans* Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.00986.

TRUDGEON, B. *et al.* Low-Temperature Biosurfactants from Polar Microbes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1183, 2020. DOI 10.3390/microorganisms8081183.

VAN HAMME, J. D. *et al.* Physiological aspects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604–620, 2006. DOI 10.1016/j.biotechadv.2006.08.001.

VIEIRA, I. M. M. *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1–18, 2021. DOI 10.1016/j.jiec.2021.05.017.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1996. DOI: doi.org/10.1007/BF00056425

ZARGAR, A. N. *et al.* Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100. **PLOS ONE**, v. 17, n. 4, p. e0264202, 2022. DOI 10.1371/journal.pone.0264202.

3 ARTIGO 2

Produção e otimização de biossurfactante por *Rhodotorula mucilaginosa* e *Psychrobacter* sp. utilizando melão de soja como fonte de carbono

Resumo

Subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substratos na obtenção de moléculas de interesse comercial. Esse estudo teve por objetivo avaliar o melão de soja como uma fonte de carbono alternativa na produção de biossurfactante pela bactéria *Psychrobacter* sp. (PSI 68) e levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (PSR 34), isoladas de painéis fotovoltaicos; bem como, realizar a otimização dessa produção. Após hidrólise ácido diluída, os açúcares (frutose, galactose, xilose, glicose, lactose e sacarose) foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance; obtendo-se valores de 122,89 e 242,31 g.L⁻¹ para o melão diluído e hidrolisado, respectivamente. No delineamento fatorial fracionado (2⁵⁻¹) as condições melão de soja diluído, sob temperatura de 50°C e rotação de 200 rpm resultaram na maior produção de biossurfactante. Atingindo um rendimento de 11,46 g.L⁻¹ e 15,51 g.L⁻¹ para *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa*, respectivamente. Estes foram significativamente maiores do que a produção nos ensaios controles que foram de 3,72 g.L⁻¹ em meio Bushnell-Haas e 4,9 g.L⁻¹ em meio Kitamoto. Os biossurfactantes produzidos nos ensaios com *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa* foram capazes de emulsionar diferentes fontes hidrofóbicas como óleo de soja (93,77 e 84,03%), óleo de motor (80,67 e 67,99%), querosene (85,66 e 62,01%) e óleo diesel (95,30 e 88,19%), além de reduzir a tensão superficial (34,32 e 34,27 mN.m⁻¹), respectivamente para bactéria e levedura.

Palavras-Chave: Biossurfactante; Melão de soja; Otimização; *Psychrobacter*; *Rhodotorula*.

3.1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais culturas agrícolas de importância na economia brasileira e mundial (De Mello *et al.*, 2023). Contudo, seu processamento origina resíduos, como o melaço de soja, que pode ser utilizado em rações animais ou substrato para microrganismos (Loman & Ju, 2016; Acosta *et al.*, 2020).

O melaço de soja é um subproduto oriundo da fabricação do concentrado proteico de soja por extração alcoólica (Cheng *et al.*, 2017). Diariamente, uma indústria que processa a soja chega a produzir, aproximadamente, 600 toneladas de concentrado proteico e 200 toneladas de melaço de soja (Siqueira *et al.*, 2008). Como sua composição é majoritariamente de açúcares solúveis, proteínas e lipídios (Loman & Ju, 2016), alguns estudos sugerem a utilização do melaço de soja como substrato para a síntese de moléculas de alto valor agregado por microrganismos (Oliveira *et al.*, 2020).

A disposição de resíduos agroindustriais deve ser feita de forma adequada e planejada, e o reaproveitamento na geração de produtos com maior valor agregado poder vir a ser vantajoso para empresas. A utilização desses resíduos como substrato em bioprocessos estimula a sua valorização. Isso permite que esforços sustentáveis e a gestão de resíduos eficaz sejam incentivados, e esse reconhecimento dado aos resíduos é a base da economia circular, que visa a sustentabilidade em nível industrial (Leitão, 2015; Vigneshwaran *et al.*, 2021).

Estudos já demonstraram que o melaço de soja pode ser usado como substrato para cultivos de microrganismos, gerando produtos de valor agregado, como butanol (DONG *et al.*, 2014), biometano (Rodrigues *et al.*, 2021), β -glucana (Acosta *et al.*, 2020) e exopolissacarídeos (Oliveira *et al.*, 2020).

Destacam-se neste trabalho os biossurfactantes, moléculas sintetizadas por microrganismos tais quais fungos, bactérias, leveduras e algas (Arifiyanto *et al.* 2020). Suas características como redução da tensão superficial, emulsificação, solubilização e molhabilidade, proporcionam aplicações diversas para esta molécula (Bujak *et al.*, 2015). Apesar das dificuldades para estabelecer as exatas vias biossintéticas e aspectos bioquímicos dos biossurfactantes (Markande *et al.*, 2021), está claro que o meio de cultivo e as propriedades físico-químicas utilizadas no crescimento microbiano, como pH, temperatura, agitação, proporção entre fontes de carbono e nitrogênio, influenciam em sua produção (Barakat *et al.*, 2017). A síntese de biossurfactantes é parte primordial da crescente tendência às práticas sustentáveis e da busca industrial por bioprodutos que minimizem os impactos

ambientais associados a moléculas sintéticas, oriundas do petróleo (Rebello *et al.*, 2014; Salwan & Sharma, 2020).

Nesse contexto, o estudo de microrganismos tem sido um campo promissor na busca de novos biossurfactantes com ampla aplicabilidade. Dada a sua capacidade de adaptação e especialização, os extremófilos possuem grande potencial biotecnológico (Giovanella *et al.*, 2020), pois sintetizam biossurfactantes com propriedades únicas e excelente estabilidade em condições adversas (Ibrahim, 2018).

O gênero *Psychrobacter* sp. abrange espécies de bactérias Gram-Negativas, que comprovadamente são produtoras de biossurfactante, identificado como glicolipídio (Trudgeon *et al.*, 2020; Riccardi *et al.*, 2022), que apresentou atividade antifúngica (Styczynski *et al.*, 2022).

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* é considerada oleaginosa, atóxica e não-patógena podendo ser usada em diferentes processos biotecnológicos (Tanimura *et al.*, 2014). O biossurfactante produzido por esse gênero de leveduras pode ser um glicolipídio ou glicoproteína (Kawahara *et al.*, 2013; Rikalović *et al.*, 2015; Kazemzadeh *et al.*, 2022; Dos Remedios Araújo Vieira Neta *et al.*, 2023).

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por *Psychrobacter* sp. e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de painéis fotovoltaicos, utilizando melão de soja como fonte de carbono.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1. Caracterização do Melaço de Soja

Amostras de melaço de soja proveniente da empresa CJ Selecta de Araguari, Minas Gerais, foram mantidas refrigeradas a -4°C até sua utilização (Al-Bahry *et al.*, 2013). Para a caracterização físico-química do melaço utilizou-se o melaço diluído, melaço clarificado, resíduo da clarificação e melaço hidrolisado (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Parâmetros utilizados para a caracterização físico-química do melaço de soja.

Parâmetro	Método ou Norma	Referência
Teor de Umidade	IAL 014/IV	IAL (2008)
Matéria Seca	IAL 015/IV	IAL (2008)
Teor de Proteínas	IAL 036/IV	IAL (2008)
Teor de Cinzas	IAL 018/IV	IAL (2008)
Extrato Alcoólico	IAL 035/IV	IAL (2008)
Sólidos Solúveis (°Brix)	IAL 315/IV	IAL (2008)
pH	IAL 017/IV	IAL (2008)
Açúcares Redutores	DNS	Miller (1959); Panda & Maiti (2019)
Teor de Lipídios	Método Bligh-Dyer	Bligh & Dyer (1959)

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2. Quantificação de Monossacarídeos e Inibidores

Amostras de melaço diluído, clarificado, de resíduo da clarificação e do hidrolisado, foram analisadas quanto a concentração de Sacarose, Lactose, Glicose, Xilose, Galactose, Arabinose, Manose e Frutose, em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de coluna Aminex HPX-87P. As análises foram feitas em cromatógrafo Shimadzu

com um detector de índice de refração RI-101 acoplado com volume da injeção das amostras de 200 μL como descrito por Lazaro *et al.* (2012). As análises foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) – Escola de Engenharia de São Carlos na Universidade de São Paulo (USP).

3.3.3. Obtenção dos Hidrolisados

3.3.3.1. Clarificação e Hidrólise Ácido Diluída

Devido a elevada viscosidade do melão bruto foi necessário, primeiramente, diluí-lo em água destilada, na proporção de 1:5 sob agitação constante e temperatura ambiente por 30 minutos (Siqueira *et al.*, 2008). Seguindo a metodologia descrita por Romão *et al.* (2012) o melão foi clarificado para retirada de impurezas, ajustando seu pH para 3 com H_2SO_4 concentrado, sendo resfriado e agitado por 24 horas. Em seguida, foi centrifugado a 1500g por 30 min. O sobrenadante foi ajustado para pH 5,5 com NaOH (6 mol.L^{-1}), e submetido a centrifugação adicional (Acosta *et al.*, 2020).

Para a hidrólise ácido diluída, o melão clarificado foi submetido a uma temperatura de 127°C , pressão de 1,5 atm por 30 min. Então, o melão hidrolisado foi resfriado até temperatura ambiente e o pH ajustado para 5,5 com NaOH a 6 mol.L^{-1} (Romão *et al.*, 2012).

3.3.4. Ensaios de Produção de Biossurfactantes

3.3.4.1 Padronização do Inóculo

A bactéria *Psychrobacter* sp. (PSI 68) e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (PSR 34) foram isoladas previamente de painéis fotovoltaicos (Moura *et al.*, 2021).

A bactéria foi cultivada em Ágar Triptona de Soja (TSA) e a levedura, em ágar Sabouraud, ambas por 48h. Com uma alça calibrada de 10 μL , a colônia foi transferida para 10 mL de Caldo Nutriente e Kitamoto (Hudson *et al.*, 1987; Kitamoto, 1990). O inóculo permaneceu por 24h para a bactéria e 48h para a levedura, a 30°C sob agitação de 120 rpm em incubadora com agitação orbital. Em seguida, centrifugou-se a 7197 g para obter-se a biomassa microbiana, que foi ressuspensa em solução salina estéril (0,85% de NaCl) para padronização do inóculo. A absorbância foi medida e ajustada para 1 a 600 nm, correspondendo a $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia. mL^{-1} . Os ensaios de produção de biossurfactante foram inoculados a 10% de cada suspensão (Marcelino *et al.*, 2019).

3.3.4.2 Meio de Cultura para os ensaios de produção de biossurfactantes

O meio de cultura para produção de biossurfactante pela bactéria foi o Bushnell-Haas, seguindo a metodologia de Ibrahim *et al.* (2013), contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: 2,2 de Na₂HPO₄; 0,01 de FeSO₄ . 7H₂O; 0,05 de NaCl; 1,4 de K₂HPO₄; 0,02 de CaCl₂ e 0,6 de MgSO₄ .7H₂O, e suplementado com 5 mL da solução estoque contendo em g.L⁻¹: 0,56 de H₃BO₃; 0,42 de CoCl₂ . 6H₂O; 1,0 de CuSO₄ . 5H₂O; 1,78 de MnSO₄ . 4H₂O; 0,39 de Na₂MoO₄ . 2H₂O; 2,32 de ZnSO₄ . 7H₂O; 1,0 de EDTA; 0,004 de NiCl₂ . 6H₂O e 0,66 KI. Enquanto que o meio de cultura para a levedura, constituiu-se de KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), NaNO₃ (20 g.L⁻¹), MgSO₄ (2 g.L⁻¹) e 4 g.L⁻¹ de glicose (Kitamoto, 1990).

Estes meios foram utilizados como controle e em ensaios de produção, em que a glicose foi substituída por melão de soja. Além disso, como o melão é uma excelente fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e oligoelementos, foi testado como meio de cultura, sem a suplementação com outros elementos químicos (Sharma & Pandey, 2020).

3.3.4.3 Planejamento Experimental

A otimização das condições de cultura, físico-químicas e dos componentes do meio foi realizada para *Psychrobacter sp.* e *R. mucilaginoso* e compreendeu cinco fatores: temperatura, rotação, fonte de carbono hidrofóbica (óleo de soja), suplementação química do meio e fonte de carbono (melão de soja diluído, clarificado e hidrolisado). Avaliou-se o índice de emulsão em diferentes tipos de fontes hidrofóbicas: óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel, além de redução da tensão superficial, como variáveis resposta para a otimização. O experimento com melhor produção de biossurfactante foi selecionado através da análise de variância (ANOVA).

A triagem para variáveis significativas foi realizada com um planejamento fatorial fracionado (2⁵⁻¹). Para detectar a não linearidade foram adicionados pontos centrais com três repetições e três réplicas por pontos de extremidade, o que resultou em 66 experimentos. A Tabela 2.2 representa os três níveis – mínimo, ponto central e máximo – dos fatores. Os resultados foram analisados selecionando os fatores com valor-F alto. Fatores que possuem valor-F abaixo do limite foram selecionados se a interação com outro fator influenciar significativamente a resposta.

Tabela 2.2 – Variáveis independentes e níveis de variação

Variáveis	Níveis de Variação		
Temperatura (°C)	15	32,5	50
Rotação (rpm)	100	150	200
Fonte de Carbono Hidrofóbica – Óleo de Soja (% v/v)	0	2,5	5
Meio Suplementado Quimicamente	Sim	Não	
Melaço de Soja ¹	Diluído (1:4)	Clarificado (1:1)	Hidrolisado (1:1)

¹A quantidade de açúcares foi avaliada após HPLC

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.4.4 Índice de Emulsão

O índice de emulsão foi analisado seguindo metodologia de Cooper & Goldenberg (1987), em que a camada hidrofóbica e o biossurfactante extraído (Pruthi & Cameotra, 2003) foram inseridos em tubo na proporção de 1:1, agitados em vórtex por 2 minutos e deixados em repouso por 24h. O resultado foi calculado pela razão entre a camada emulsionada e a altura total.

3.3.4.5 Tensão Superficial

A tensão superficial do biossurfactante extraído (Pruthi & Cameotra, 2003) foi mensurada utilizando um medidor de ângulo de contato Ramé-Hart 250, após fotografar a gota suspensa em micro-seringa, no software *DROPImage Advanced*, seguindo método de Daerr & Mogne (2016) a tensão será medida no software ImageJ pelo plugin *Pendent_Drop*.

3.3.4. Monitoramento das Produções de Biossurfactante Otimizadas

O ensaio otimizado foi realizado com frascos fechados em incubadora orbital sob agitação e temperatura controladas (Hudson *et al.*, 1987; Kitamoto, 1990). O meio de cultivo foi centrifugado a 7197 g, 4°C por 20 min para obtenção do sobrenadante (Das & Kumar, 2018).

Durante os ensaios, amostras foram retiradas e analisadas quanto ao cultivo microbiano, por biomassa seca (Sharma *et al.*, 2019); consumo de açúcares por método de DNS (Miller, 1959); pH por meio de um pHmetro (Almeida & Nohama, 2006) e tensão superficial por método de gota pendente (Daerr & Mogne, 2016).

3.3.4.1. Extração do Biossurfactante

O sobrenadante foi filtrado com membrana de 0,22 μm . A acetona foi adicionada ao sobrenadante em proporção 1:1 e mantidos a 4°C por 24 horas. O biossurfactante foi recuperado por precipitação após centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm e seco a 40°C (Pruthi & Cameotra, 2003). O pH do biossurfactante extraído foi alterado para 2, e adicionado uma fase orgânica, na proporção de fase (aquosa:orgânica) 1:2, sendo a fase orgânica de acetato de etila (Biselli et al. 2020). A fase orgânica será seca a 40°C e o biossurfactante ressuspendido em água destilada para análise da tensão superficial.

3.3.5 Análise dos Resultados

Todos os experimentos serão realizados em triplicata e os resultados serão analisados por ANOVA ($p > 0,05$). Os erros-padrão para os valores médios, com nível de confiança de 90%, serão calculados e representados como barras de erro-padrão em todas as representações gráficas.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Caracterização do Melaço de Soja e dos Hidrolisados

A caracterização do melaço de soja diluído foi feita quanto ao teor de umidade (83,25%), conteúdo proteico (2,83 g.L⁻¹), teor de cinzas (1,92%), pH (6,02), determinação de açúcares redutores (2,25 g.L⁻¹), os valores comparativos entre os outros tratamentos estão representados na tabela 2.3.

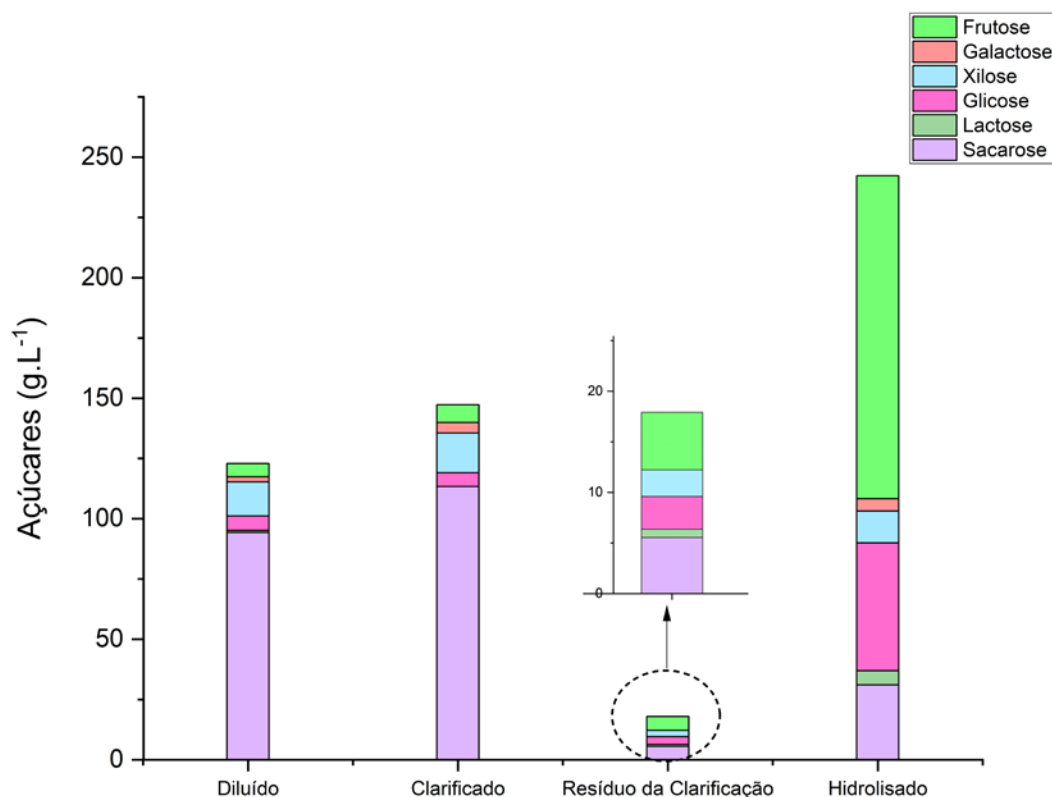
Tabela 2.3 – Dados comparativos da composição (% e g.L⁻¹) do melaço de soja diluído, clarificado, hidrolisado e do resíduo de clarificação.

Parâmetro	Umidade (%)	Matéria Seca (%)	Teor Prot. (g.L ⁻¹)	Cinzas (%)	°Brix	pH	Açúcares Redutores (g.L ⁻¹)	Teor de Lipídios (%)	
								Teor Lip. (%)	Extrat. Alcólica (%)
Melaço Diluído	83,25 ± 0,48	15,81 ± 0,29	2,83 ± 0,32	1,92 ± 0,30	15 ± 0	6,02 ± 0,31	2,25 ± 0,21	0,86 ± 0,10	6,00 ± 0,98
Melaço Clarificado	84,14 ± 1,85	14,35 ± 0,27	0,20 ± 0,03	1,81 ± 0,34	13,67 ± 0,58	5,74 ± 0,01	5,19 ± 0,13	0,06 ± 0,03	5,57 ± 0,73
Resíduo da Clarificação	95,42 ± 0,13	17,72 ± 0,42	2,28 ± 0,51	0,25 ± 0,08	8 ± 0	3,23 ± 0,03	2,11 ± 0,16	0,79 ± 0,08	1,32 ± 0,43
Melaço Hidrolisado	85,71 ± 0,35	14,04 ± 0,18	0,30 ± 0,07	3,08 ± 0,06	13 ± 0	5,57 ± 0,02	71,08 ± 1,54	0,05 ± 0,01	4,37 ± 0,49

O teor de lipídios está de acordo com o encontrado por Sancheti *et al.* (2023). O processo de clarificação reduziu o teor de proteínas e lipídios, praticamente removendo-os por completo, no entanto, esse processo aumentou a quantidade de açúcares redutores. Isso foi comprovado pelo resíduo da clarificação ser composto majoritariamente de proteínas e lipídios.

O melaço de soja diluído mostrou-se um subproduto rico em carboidratos (Figura 2.1) como sacarose (94,33 g.L⁻¹), glicose (6,0489 g.L⁻¹), xilose (14,10 g.L⁻¹), galactose (2,13 g.L⁻¹), frutose (5,47 g.L⁻¹) e lactose (0,815 g.L⁻¹). Estes açúcares foram encontrados nos trabalhos de Sancheti *et al.* (2023) e Romão *et al.* (2012), que quantificaram os açúcares presentes no melaço de soja e seus hidrolisados. O aumento da galactose e frutose no melaço clarificado, pode ser justificada pela quebra da estaquiase, oligossacarídeo composto de galactose e rafinose – glicose e frutose (Leblanc *et al.*, 2004). Já o melaço hidrolisado teve um aumento na quantidade de frutose, galactose, glicose e redução na sacarose.

Figura 2.1 - Composição dos açúcares presentes no melão de soja diluído, melão com hidrólise ácido-diluída, clarificado e no resíduo de clarificação quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)



Fonte: Elaborado pela autora.

Os pré-tratamentos avaliados aumentaram a quantidade de açúcares no melão clarificado e hidrolisado. Considerando a quantidade total de açúcares, o melão diluído continha $122,88 \text{ g.L}^{-1}$, o clarificado $147,29 \text{ g.L}^{-1}$, o resíduo dessa clarificação $17,92 \text{ g.L}^{-1}$ e o melão hidrolisado, com a maior liberação de monossacarídeos, apresentou $242,31 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados obtidos nesse estudo confirmaram que, tanto o melão diluído, como o clarificado e o hidrolisado podem ser utilizados como substrato, pois contêm açúcares fermentescíveis.

3.4.2. Delineamento Experimental e Produção de Biossurfactante (BS)

A produção do biossurfactante (BS) foi realizada a partir do delineamento fatorial fracionado. Como resposta a esse delineamento foi utilizado índice de emulsão ($\%E_{24}$) e a tensão superficial (TS). Os valores do teste de Tuckey, devido a complexidade do experimento, (p -valor) foram considerados significantes quando menores ou próximos de 0,10. Nas tabelas 2.4 e 2.5 foi possível analisar quais variáveis isoladas e suas interações foram significativas.

Dentro da faixa experimental os índices de emulsão de óleo de motor e querosene para *R. mucilaginoso* foram desconsiderados nesta análise pois não apresentaram resultados significativos em relação as variáveis independentes, que apresentaram um coeficiente de determinação menor que 0,7. No entanto, as interações com efeitos estaticamente significativo ($p < 0,10$) estão apresentadas na tabela 2.6. Isso também foi observado por Marcelino *et al.* (2019), em que o sobrenadante e o querosene formaram emulsões superiores a 50% em amplas variações de temperaturas.

A maior emulsão e menor tensão ocorreram em pontos extremos, nos experimentos 19, 23 e 27 (Apêndice A), indicando que o ponto máximo de eficiência do biossurfactante está nas condições extremas do planejamento, sendo 50°C, 200 rpm, 0% de fonte hidrofóbica e melaço de soja diluído. Os resultados do Valor-*p* indicaram que para um nível de significância de até 10%, pode-se rejeitar a hipótese nula, ou seja, que condições físico-químicas, suplementação química do meio, fonte hidrofóbica e de carbono não influenciam na eficiência e produção de biossurfactantes. Dessa forma foi possível constatar que há 90% de confiança de que o modelo foi significativo.

Tabela 2.4 – Valor-*p* e valor-*f* dos efeitos das variáveis independentes – temperatura, rotação, fonte hidrofóbica, suplementação química e tipo de melaço de soja – nas variáveis dependentes – tensão superficial e emulsão – avaliadas para a produção de BS por *Psychrobacter* sp.

Efeitos	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)		Óleo de Soja (%E ₂₄)		Óleo de Motor (%E ₂₄)		Querosene (%E ₂₄)		Óleo Diesel (%E ₂₄)	
	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P
x1	6,11	0,017	-	-	12,83	< 0,005	11,03	< 0,005	14,18	< 0,005
x2	4,27	0,044	-	-	8,15	0,006	19,02	< 0,005	-	-
x3	14,26	< 0,005	-	-	17,85	< 0,005	13,3	< 0,005	12,07	< 0,005
x4	-	-	-	-	-	-	7,24	0,01	-	-
x5	265,77	< 0,005	272,91	< 0,005	260,18	< 0,005	268,94	< 0,005	520,39	< 0,005
x1*x2	6,34	0,015	4,21	0,046	15,08	< 0,005	-	-	30,04	< 0,005
x1*x3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x1*x4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x1*x5	-	-	6,46	0,014	6,36	0,015	12,48	< 0,005	14,18	< 0,005
x2*x3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x2*x4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x2*x5	2,84	0,099	-	-	5,29	0,026	11,37	< 0,005	-	-
x3*x4	-	-	-	-	-	-	-	-	30,04	< 0,005
x3*x5	49,34	< 0,005	5,14	0,028	11,09	< 0,005	14,88	< 0,005	12,07	< 0,005
x4*x5	-	-	-	-	10,02	< 0,005	4,99	0,03	5,37	0,025
x1*x2*x3*x5	-	-	-	-	5,65	0,022	15,82	< 0,005	5,64	0,022
R ²	0,9229		0,8879		0,9026		0,8951		0,9412	

x₁ = temperatura, x₂ = rotação, x₃ = fonte hidrofóbica, x₄ = suplementação química, x₅ = melaço de soja

Os maiores coeficiente de determinação (R^2) foram observados em relação a emulsão em óleo diesel e TS ($R^2 = 0,9412$ e $0,9229$, respectivamente), ou seja, 94,12 e 92,29% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo ajustado. Os menores R^2 (0,53 e 0,665) foram observados para a emulsão em óleo de motor e querosene, respectivamente quando utilizado a cepa *R. mucilaginoso* (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Valor-*p* e valor-*f* dos efeitos das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de BS por *R. mucilaginoso*.

Efeitos	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)		Óleo de Soja (%E ₂₄)		Óleo de Motor (%E ₂₄)		Querosene (%E ₂₄)		Óleo Diesel (%E ₂₄)	
	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P	Valor-F	Valor-P
x1	-	-	8,61	0,005	-	-	-	-	6,1	0,017
x2	-	-	3,04	0,088	-	-	4,40	0,041	-	-
x3	7,22	0,01	5,21	0,027	4,85	0,33	-	-	11,39	< 0,005
x4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x5	116,75	< 0,005	155,02	< 0,005	48,46	< 0,005	11,63	< 0,005	54,99	< 0,005
x1*x2	9,79	< 0,005	6,09	0,017	3,80	0,057	3,59	0,065	5,08	0,029
x1*x3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x1*x4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x1*x5	-	-	-	-	-	-	-	-	20,75	< 0,005
x2*x3	3,08	0,086	-	-	-	-	-	-	-	-
x2*x4	3,2	0,08	-	-	3,6	0,064	-	-	4,74	0,035
x2*x5	6,56	0,014	3,77	0,058	-	-	-	-	-	-
x3*x4	-	-	-	-	6,23	0,016	3,38	0,073	15,69	< 0,005
x3*x5	3,01	0,089	-	-	-	-	-	-	2,78	0,10
x4*x5	-	-	-	-	-	-	9,37	< 0,005	6,74	0,013
x1*x2*x3*x5	-	-	3,40	0,072	-	-	-	-	6,94	0,011
R ²	0,825		0,8425		0,665		0,5356		0,7807	

x₁ = temperatura, x₂ = rotação, x₃ = fonte hidrofóbica, x₄ = suplementação química, x₅ = melação de soja

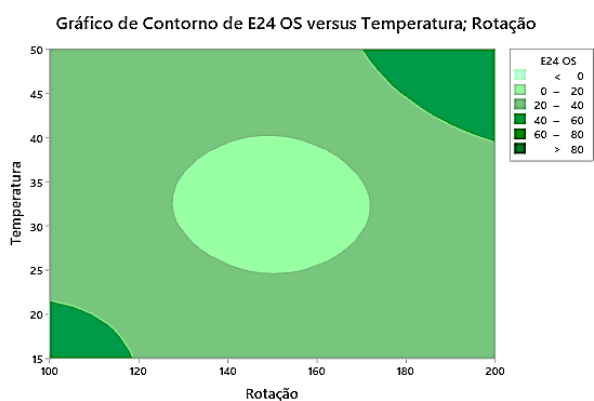
A partir dos resultados obtidos foi utilizada a ferramenta de otimização do programa Minitab 19 para calcular o ponto otimizado com alvo no máximo de emulsão e mínimo de TS. Os valores das variáveis no ponto otimizado foram x₁ = 50°C, x₂ = 200 rpm, x₃ = 0%, x₄ = sem suplementação, x₅ = Melação de soja diluído. Os valores de emulsão em óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel e tensão superficial foram em média, respectivamente, 93,77%; 80,66%; 85,66%; 95,3% e 34,32 mN.m⁻¹ para a *Psychrobacter* sp., com *desirability* de 0,89 e 84,03%; 67,99%; 62,02%; 88,19% e 34,27 mN.m⁻¹ para *R. mucilaginoso*, com *desirability* de 0,78.

Para observar o efeito das variáveis independentes sobre o índice de emulsão e redução da tensão superficial foram construídas representações gráficas com curvas de contorno. Apenas as relações que foram significativas foram selecionadas para as representações.

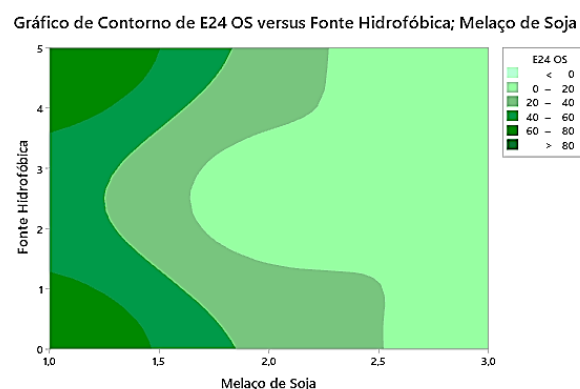
Com *Psychrobacter* sp. observou-se que a faixa ótima para obtenção de emulsão em óleo de soja esteve entre os intervalos de 45 – 50°C e 15 – 20°C de temperatura; e 100 – 110 rpm e 180 – 200 rpm de rotação (Figura 2.2A); 4 – 5% e 0 – 1% de fonte hidrofóbica e melaço de soja diluído (Figura 2.2B) e 47,5 – 50°C de temperatura e melaço de soja diluído (Figura 2.2C). Através destes gráficos foi possível afirmar que o valor máximo de emulsão encontra-se em uma região próxima ao ponto extremo superior, o que corrobora com os resultados da otimização.

Figura 2.2 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de Soja: A) Rotação e temperatura; B) melaço de soja e fonte hidrofóbica e C) temperatura e melaço de soja para a bactéria *Psychrobacter* sp.

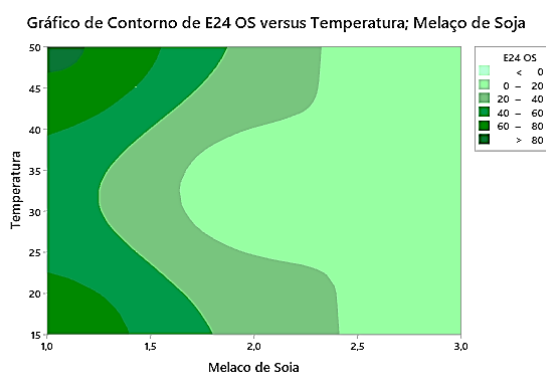
A



B



C

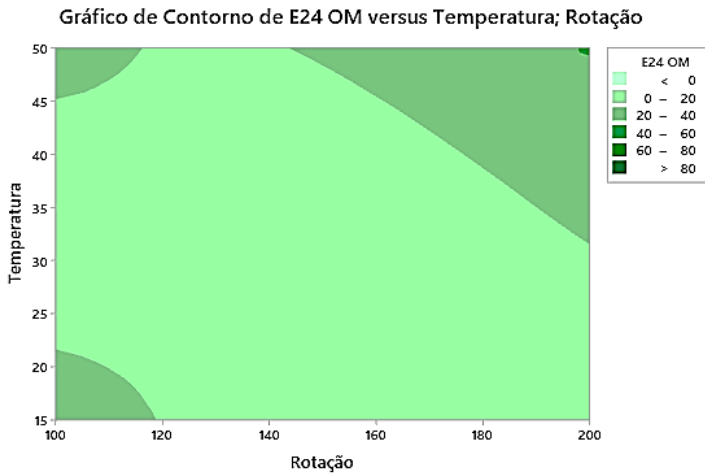


Os intervalos ótimos de emulsão em óleo de motor está entre 50°C e 200 rpm de rotação (Figura 2.3A); 40 – 50°C temperatura e melaço de soja diluído (Figura 2.3B); 100 – 110 rpm e 175 – 200 rpm e melaço de soja diluído (Figura 2.3C); 0 – 1,5% de fonte hidrofóbica

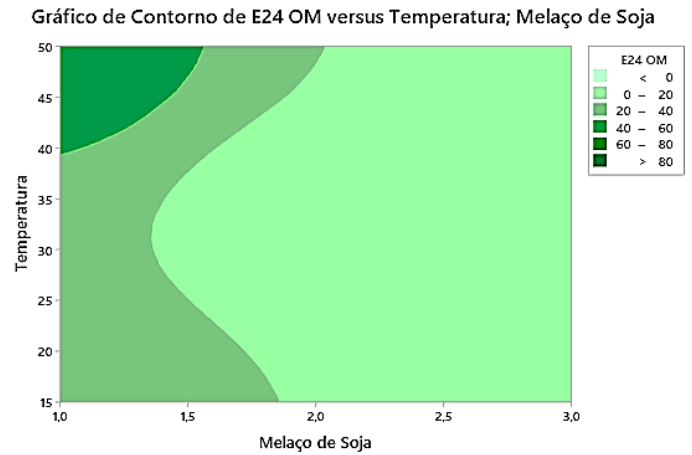
e melão de soja diluído (Figura 2.3D). Assim como com o óleo de soja a maximização de emulsão ocorreu próxima aos pontos extremos.

Figura 2.3 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de motor: A) Rotação e temperatura; B) melão de soja e temperatura; C) melão de soja e rotação e D) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.

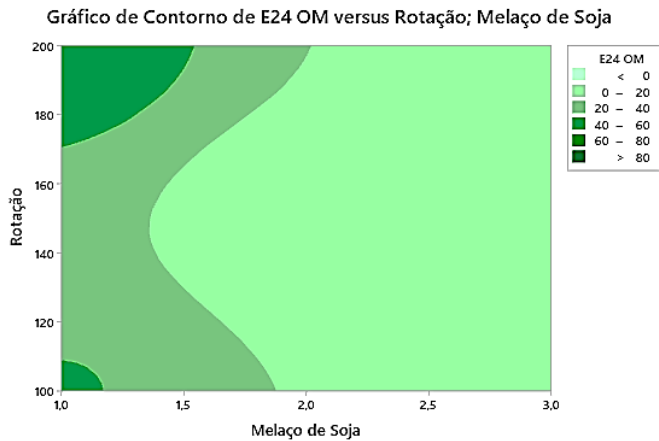
A



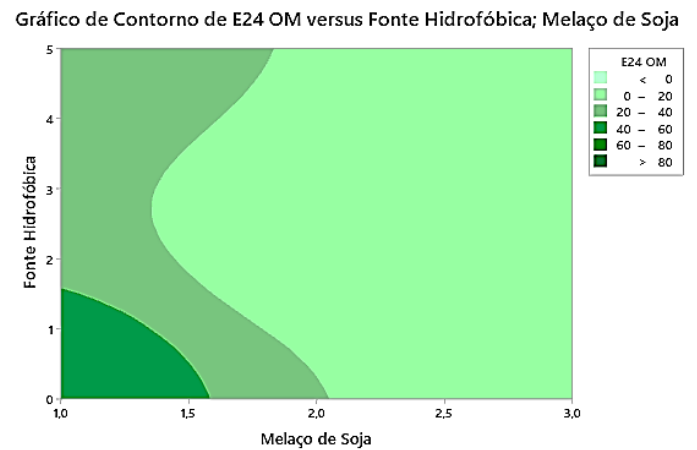
B



C



D

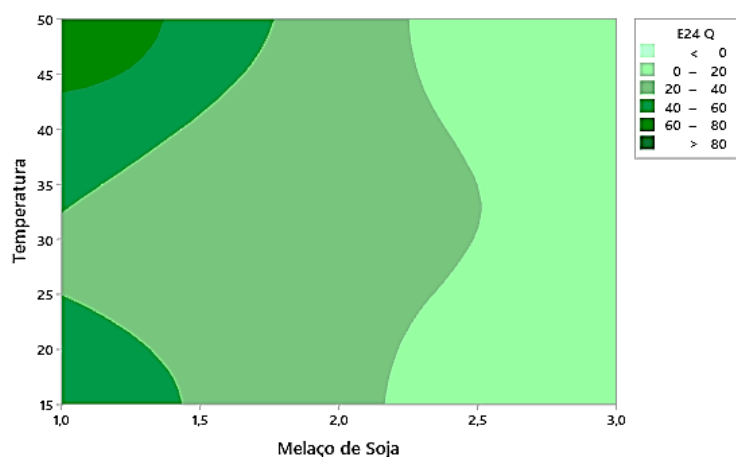


Os intervalos com as maiores emulsões para o querosene estiveram entre 45 – 50°C de temperatura e melão de soja diluído (Figura 2.4A); 190-200 rpm de rotação e 0 – 0,5% de fonte hidrofóbica (Figura 2.4B) e 180 – 200 rpm de rotação e melão de soja diluído (Figura 2.4C); 0 – 1% de fonte hidrofóbica e melão de soja diluído. O valor máximo de emulsão foi obtido em uma região próxima ao ponto extremo superior, o que corrobora com os resultados da otimização.

Figura 2.4 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para querosene: A) temperatura e melão de soja; B) rotação e fonte hidrofóbica; C) melão de soja e rotação e D) melão de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.

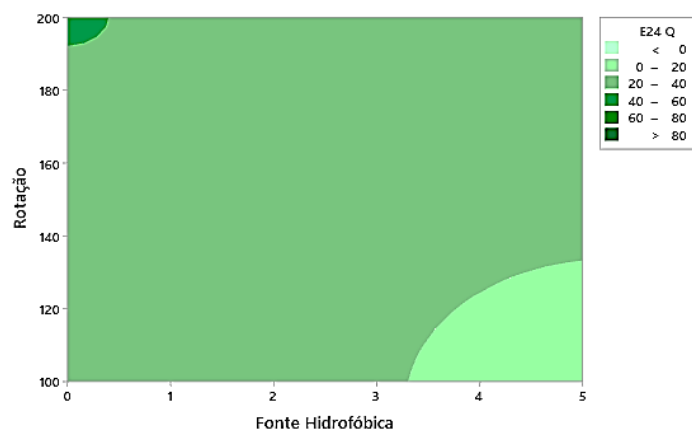
A

Gráfico de Contorno de E24 Q versus Temperatura; Melão de Soja



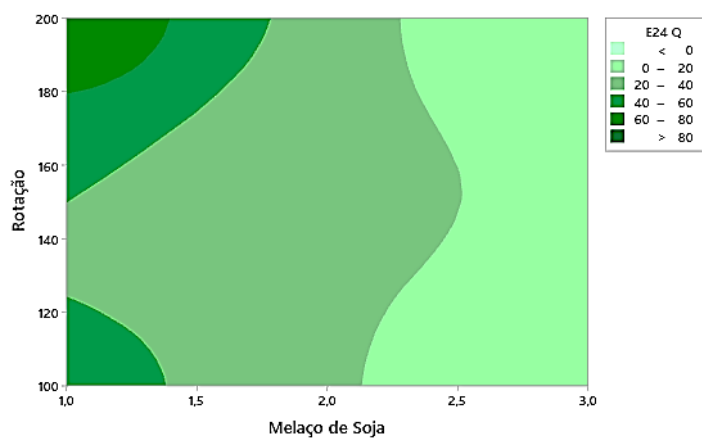
B

Gráfico de Contorno de E24 Q versus Rotação; Fonte Hidrofóbica



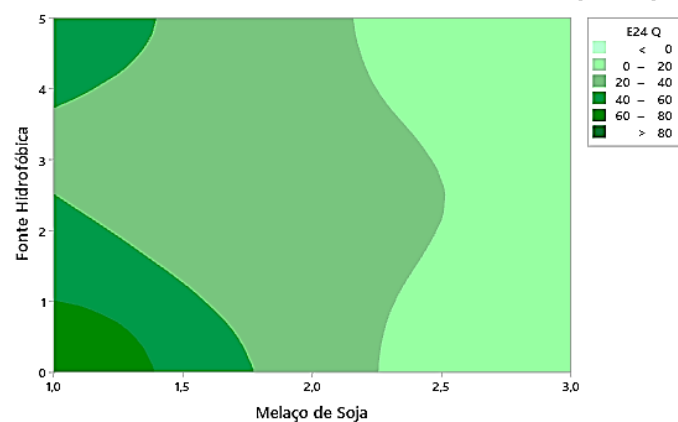
C

Gráfico de Contorno de E24 Q versus Rotação; Melão de Soja



D

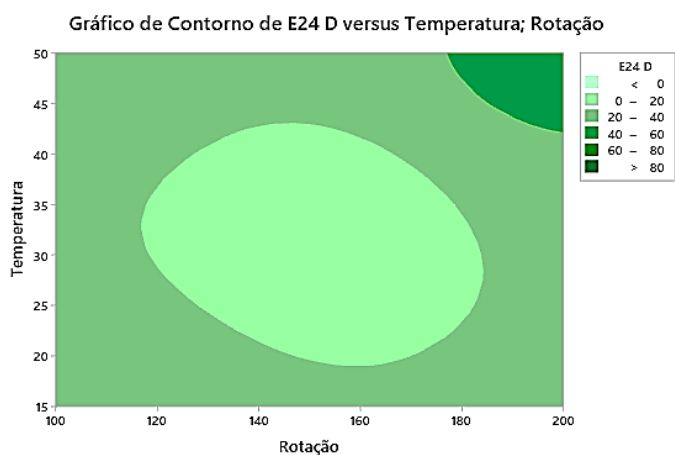
Gráfico de Contorno de E24 Q versus Fonte Hidrofóbica; Melão de Soja



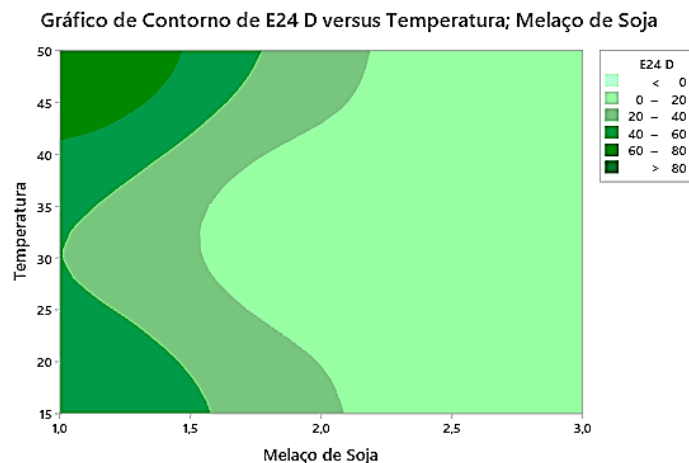
As faixas ótimas para obtenção de emulsão em óleo de soja estiveram entre os intervalos de 45 – 50°C e 15 – 20°C de temperatura e 100 – 110 rpm e 180 – 200 rpm de rotação (Figura 2.5A); 4 – 5% e 0 – 1% de fonte hidrofóbica e melão de soja diluído (Figura 2.5B) e 47,5 – 50°C de temperatura e melão de soja diluído (Figura 2.5C). O valor máximo de emulsão foi obtido em uma região próxima ao ponto extremo superior, o que corrobora com os resultados da otimização.

Figura 2.5 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo diesel: A) temperatura e rotação; B) temperatura e melação de soja e C) melação de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.

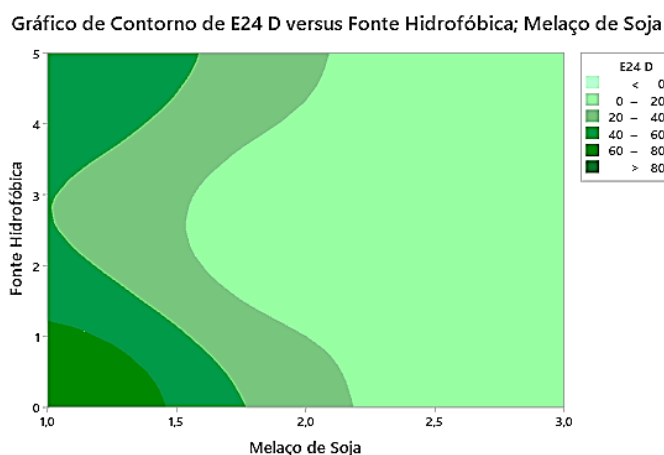
A



B



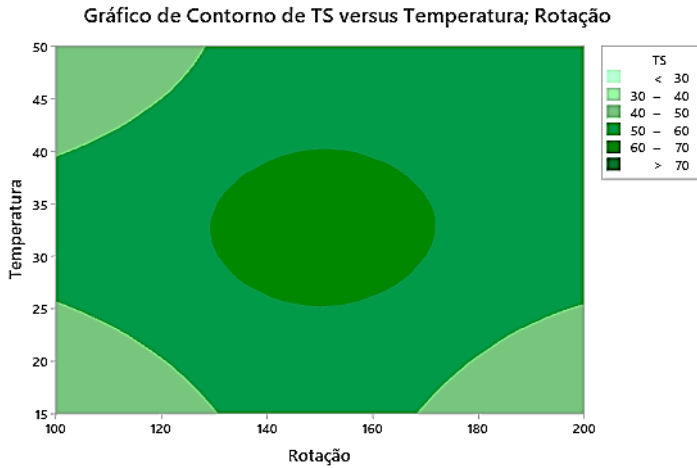
C



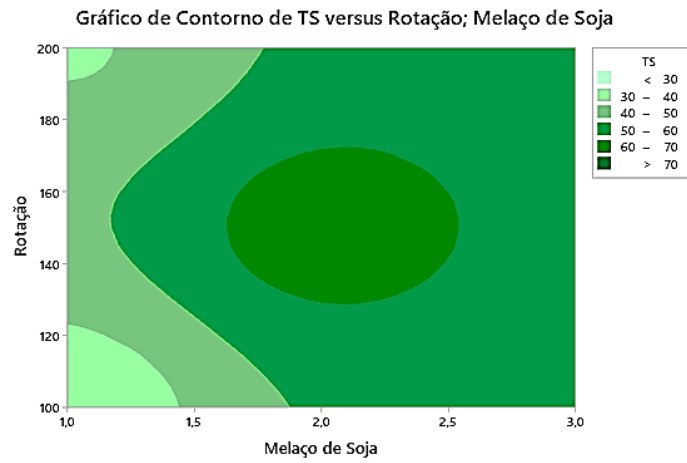
Quanto a TS foi possível identificar que a faixa ótima para reduzir a tensão esteve entre 40 – 50°C; 15 – 25°C de temperatura e 100 – 130 rpm; 170 – 200 rpm de rotação (Figura 2.6A); 100 – 120 rpm; 190 – 200 rpm de rotação e melação de soja diluído (Figura 2.6B) e 0% de fonte hidrofóbica e melação de soja diluído (Figura 2.6C). Os valores mais baixos de TS estão próximos aos pontos extremos, diminuindo ao máximo a variável dependente.

Figura 2.6 - Gráfico de Contorno de tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$): A) temperatura e rotação; B) rotação e melaço de soja e C) melaço de soja e fonte hidrofóbica para a bactéria *Psychrobacter* sp.

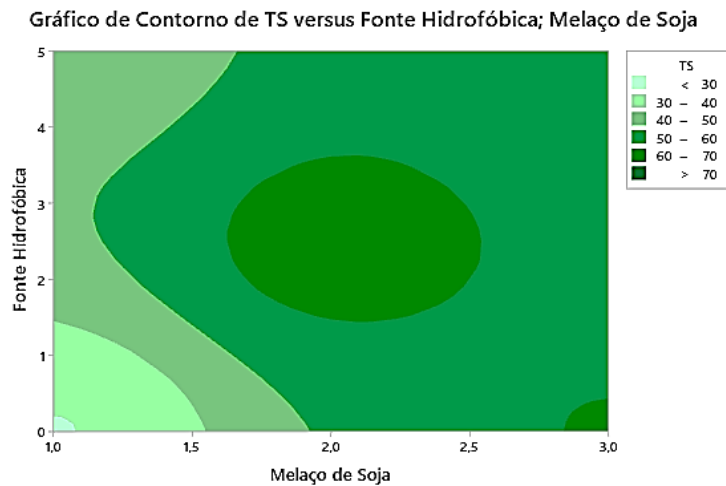
A



B

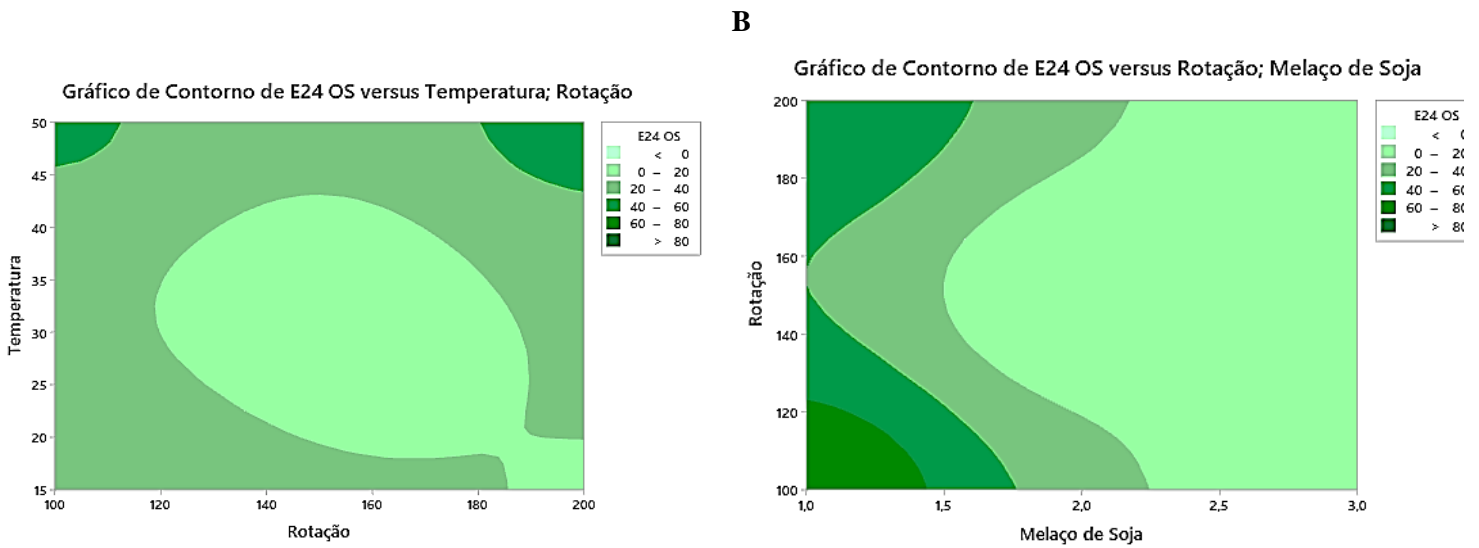


C



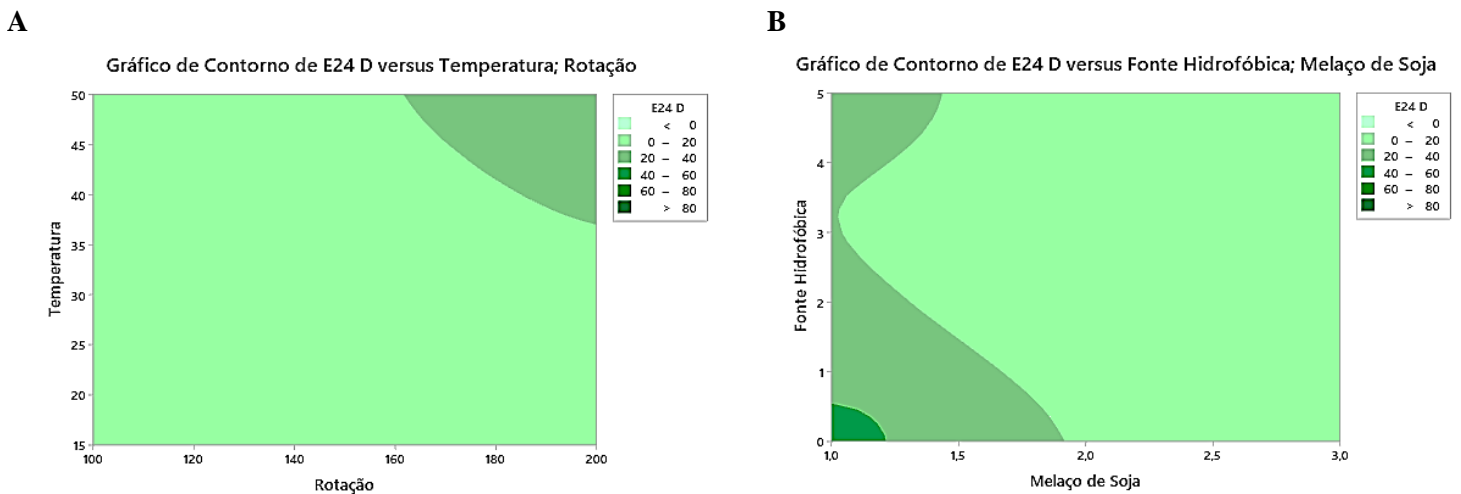
Para os ensaios com *R. mucilaginoso* os maiores intervalos com as maiores emulsões para o óleo se soja foram 45 – 50°C de temperatura e 100 – 110 rpm e 180 – 200 rpm de rotação (Figura 2.7A); 100 – 120 rpm e melaço de soja diluído (Figura 2.7B).

Figura 2.7 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo de Soja: A) Rotação e temperatura e B) melaço de soja e rotação para a levedura *R. mucilaginosa*.



Foram analisados e os intervalos com maximização de emulsão para óleo diesel, uma fonte hidrofóbica, foram de 40°C – 50°C de temperatura e 170 – 200 rpm de rotação (Figura 2.8A) e 0 – 0,5% de fonte hidrofóbica e melaço de soja diluído (Figura 2.8B). Os maiores índices de emulsão foram obtidos nos pontos extremos.

Figura 2.8 - Gráfico de Contorno de índice de emulsão (%E₂₄) para óleo diesel: A) Rotação e temperatura e B) melaço de soja e fonte hidrofóbica para a levedura *R. mucilaginosa*.

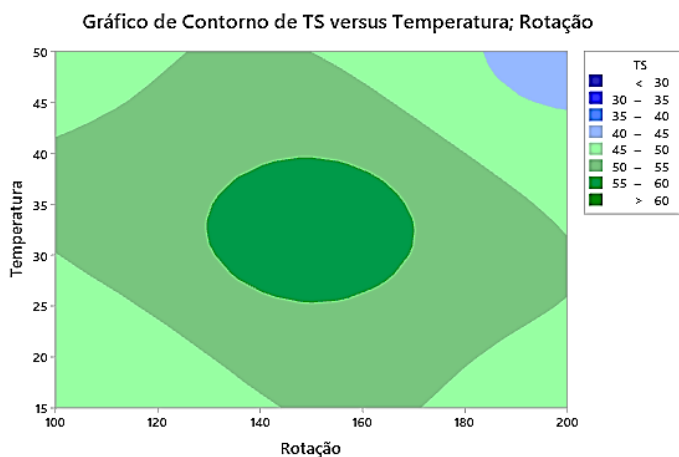


A maior redução da tensão superficial obtida com *R. mucilaginosa* ocorreu nos intervalos de 45 – 50°C de temperatura e 180 – 200 rpm de rotação (Figura 2.9A); 100 – 115 rpm e 0 – 0,75% de fonte hidrofóbica (Figura 2.9B); 100 – 120 rpm de rotação e melaço de soja diluído (Figura 2.9C) e 0 – 1% de fonte hidrofóbica e melaço de soja diluído (Figura

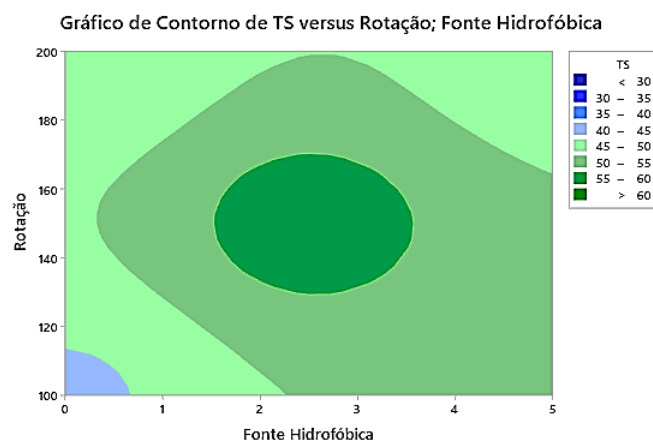
2.9D). Por meio desses foi possível observar que valores mais baixos estão próximos aos pontos extremos, diminuindo ao máximo a variável dependente.

Figura 2.9 - Gráfico de Contorno de tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$): A) temperatura e rotação; B) rotação e fonte hidrofóbica; C) melço de soja e rotação e D) fonte hidrofóbica e melço de soja para a *R. mucilaginosa*.

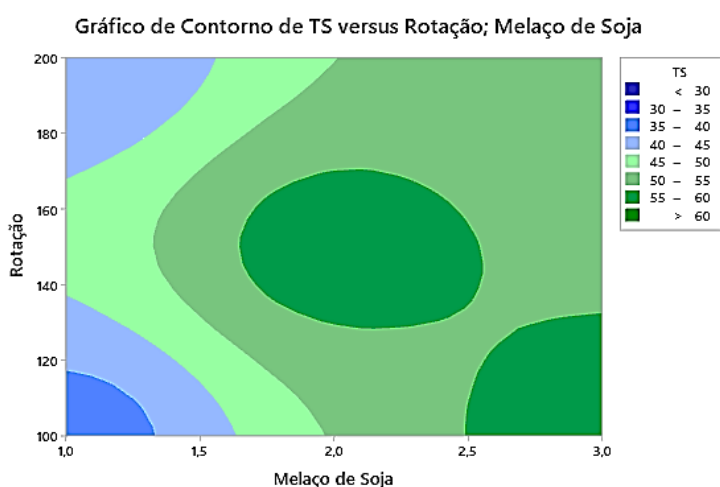
A



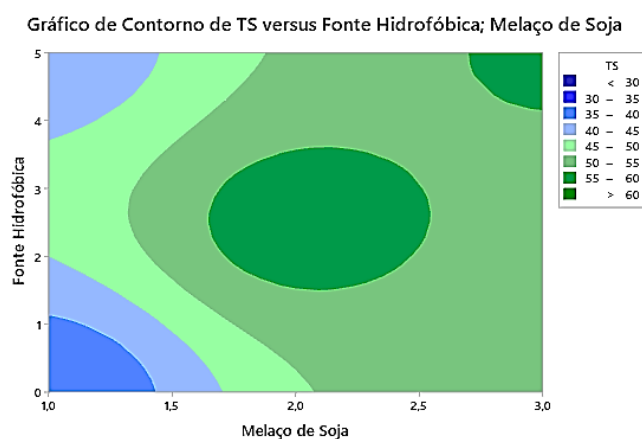
B



C



D



Por meio do planejamento fatorial completo foi possível observar que *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa* possuem capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades emulsificantes e tensoativas. Agentes emulsificantes são aqueles que permanecem com, no mínimo, 50% de emulsão em 24h (Willumsen & Karlson, 1996) e tensoativos que reduzem a tensão superficial da água. Considerando esse critério, as biomoléculas produzidas pelas cepas *Psychrobacter* sp. (Fig. 2.10A) e *R. mucilaginosa* (Fig. 2.10B) obtiveram resultados promissores, capazes de emulsionar as fontes hidrofóbicas óleo de soja (93,77 e 84,03%), óleo de motor (80,67 e 67,99%), querosene (85,66 e 62,01%) e óleo

diesel (95,30 e 88,19%), além de reduzir a tensão superficial (34,32 e 34,27 mN.m⁻¹), respectivamente.

Com relação ao rendimento da produção otimizada, atingiu-se resultados de 11,46 g.L⁻¹ e 15,51 g.L⁻¹ (Fig. 2.10) para *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa*, respectivamente, significativamente maior do que a produção no ensaio controle de 3,72 g.L⁻¹ em meio Bushnell-Haas e 4,9 g.L⁻¹ em meio Kitamoto.

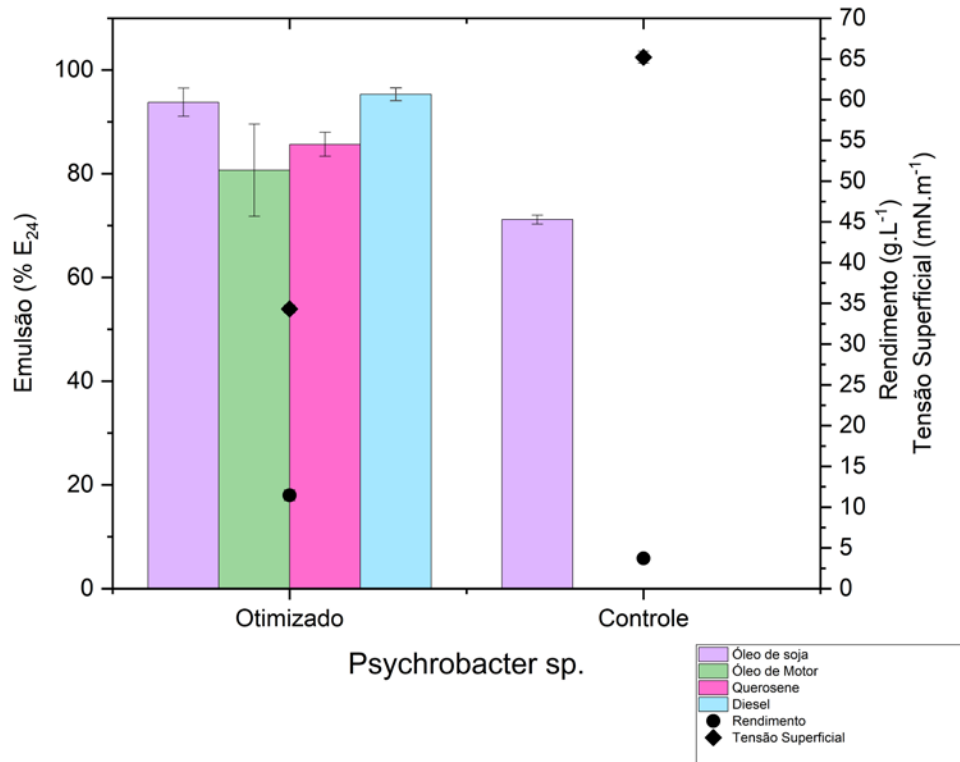
Foi possível notar que em todas as condições otimizadas o índice de emulsão foi superior a 50%, sendo assim, estáveis (Marcelino *et al.*, 2019; Araújo *et al.*, 2020). No estudo de Saisa-Ard *et al.*, (2014) a cepa *Psychrobacter* sp. foi capaz de reduzir a tensão superficial para 29,5 mN.m⁻¹, atingiu uma emulsão de 40,3% após 24h com rendimento de 1,36 g.L⁻¹ de biossurfactante, a produção ocorreu em meio mínimo em sais (MSM) por 168h.

A cepa isolada do painel solar utilizada no presente trabalho apresentou resultados, em meio controle (Bushnell-Haas). de emulsão em óleo de soja de 71,15% (Fig. 2.10A), contudo, o ensaio controle não foi capaz de reduzir a tensão superficial para menos de 65,21 mN.m⁻¹. Trudgeon *et al.* (2020) estudaram a produção de biossurfactante por *Psychrobacter* sp. que atingiu 58,3% de emulsão em meio M9 em 10 dias.

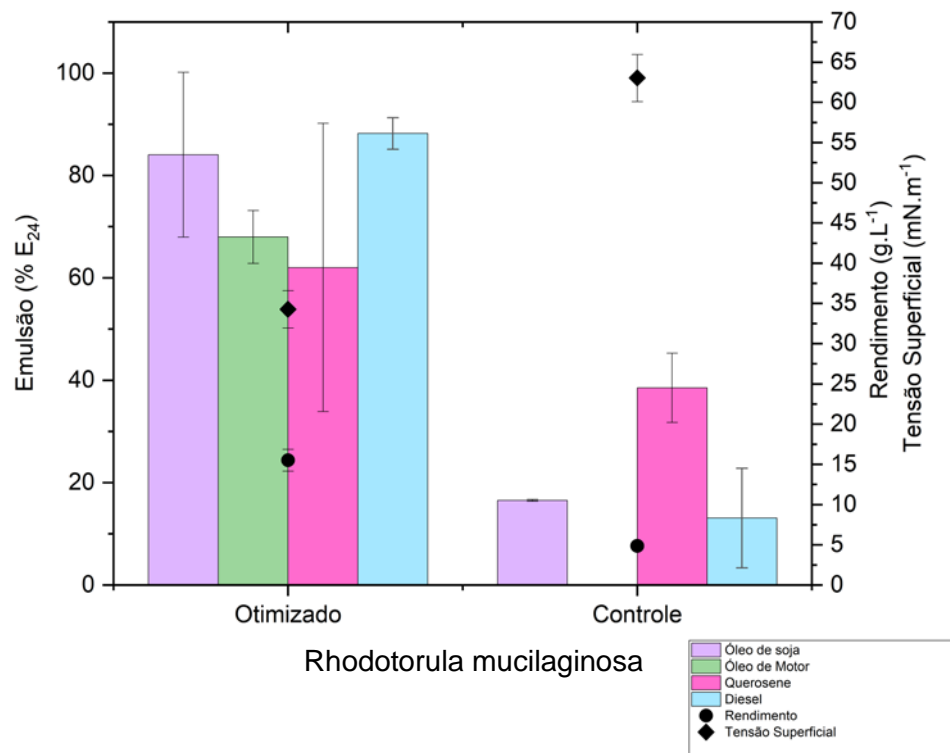
A levedura *R. mucilaginosa* (LBP5) foi estudada por Dos Remedios Araújo Vieira Neta *et al.* (2023), que apresentou propriedades tensoativas, reduzindo a tensão para 35 mN.m⁻¹, e emulsificantes – 65% – em óleo de soja. Além de um rendimento de 10,08 g.L⁻¹, que é menor do que o obtido na produção otimizada deste estudo, se comparado os rendimentos. Kazemzadeh *et al.* (2022) tiveram um rendimento de biossurfactante de 6,2 g.L⁻¹ para *R. mucilaginosa* (SKF2) em meio MSM por 5 semanas, a tensão foi reduzida para 25,2 mN.m⁻¹ e 20% de emulsão.

Figura 2.10 – Índice de Emulsão (%E₂₄) em óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel; Rendimento e Tensão Superficial (mN.m⁻¹) comparando produção controle e otimizada para (A) *Psychrobacter* sp. e (B) *R. mucilaginosa*.

A



B



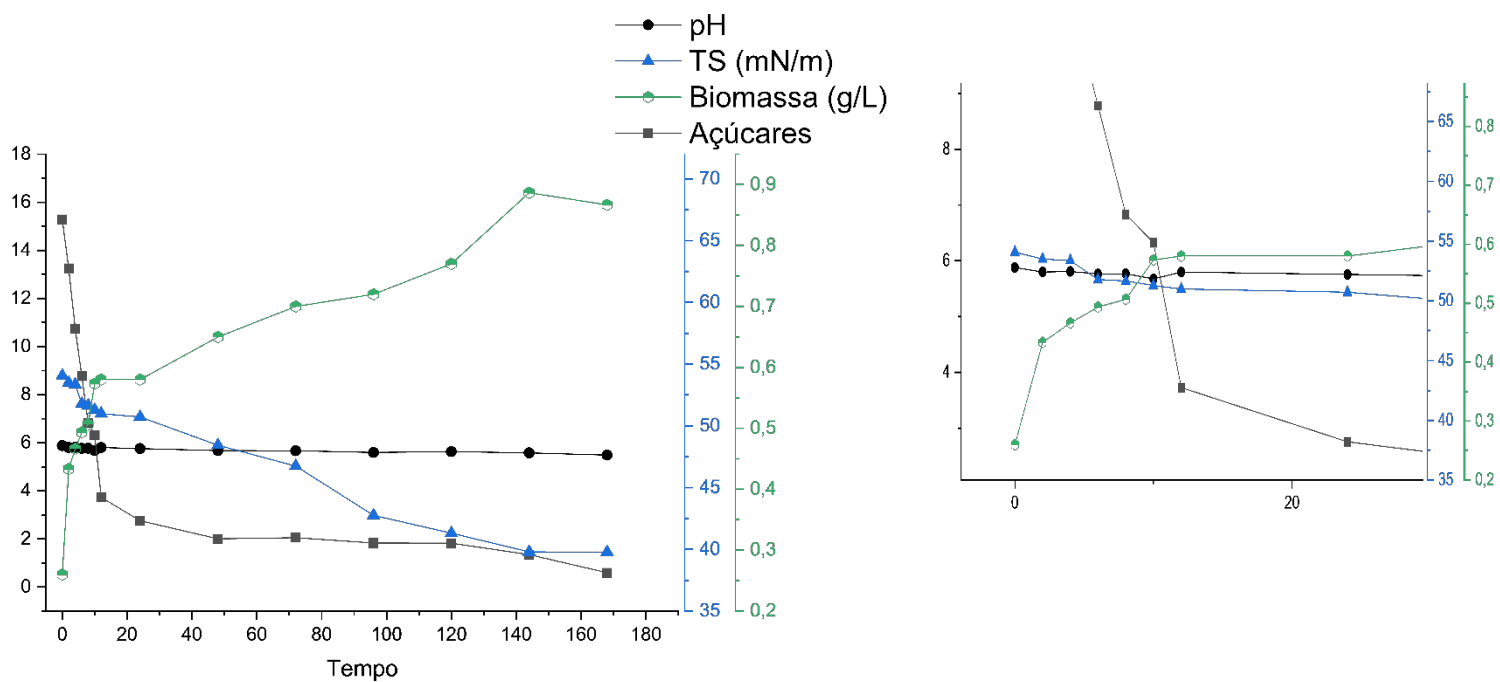
O crescimento celular, medido por biomassa seca (g.L^{-1}), a tensão superficial, o pH e o consumo de açúcares foram monitorados durante a fermentação com *Psychrobacter* sp. (Figura 2.11A) e *R. mucilaginosa* (Figura 2.11B). Para ambas as cepas o crescimento exponencial iniciou-se no tempo de 2h, e, conseqüente aumento no consumo de açúcares. A curva de crescimento entrou em estabilidade em 24 h, concomitantemente, a tensão superficial começou a apresentar declínio. Por fim, o pH se manteve estável durante toda a fermentação numa faixa entre 5,8 e 5,4 para *Psychrobacter* sp. e 5,8 e 5,6 para *R. mucilaginosa*.

A redução da tensão ocorrer quando o crescimento permanece estável, o que corrobora com o descrito por Shah et al (2016), ou seja, que microrganismos produzem biossurfactantes durante a fase estacionária de crescimento.

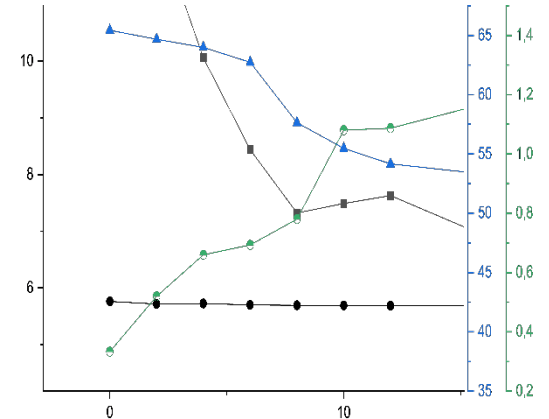
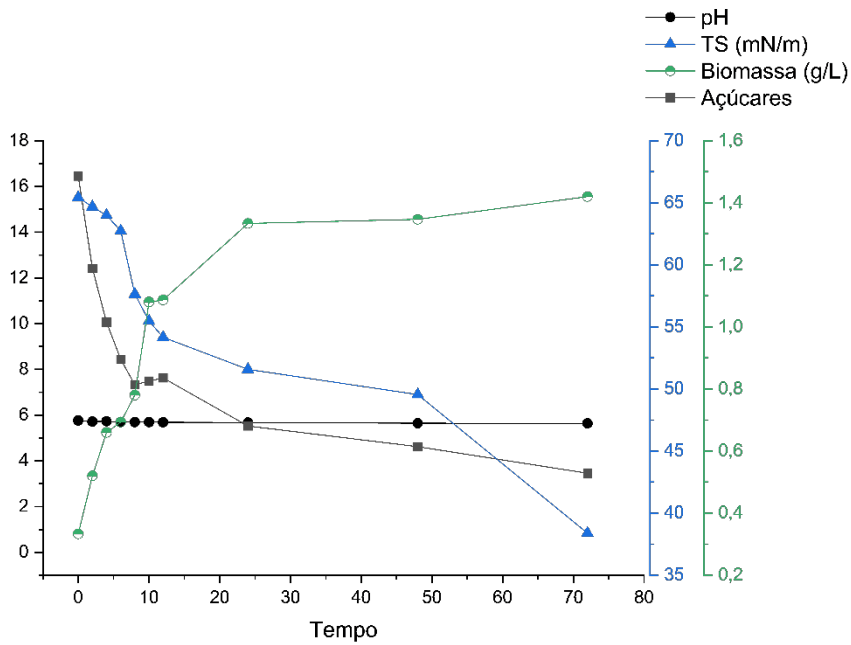
Observou-se que houve aumento da biomassa seca durante a fermentação, passando de $0,26 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,86 \text{ g.L}^{-1}$ para *Psychrobacter* sp. e de $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ para $1,42 \text{ g.L}^{-1}$ para *R. mucilaginosa*.

Figura 2.11 - Gráficos de monitoramento de crescimento microbiano, pH, tensão superficial e açúcares durante a fermentação para (A) *Psychrobacter* sp. e (B) *R. mucilaginosa*.

A



B



Com relação a concentração de açúcares, a fermentação iniciou-se com $15,3 \text{ g.L}^{-1}$ e $16,4 \text{ g.L}^{-1}$, para *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa* e no final com $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,45 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares, respectivamente. É inferido, também, que os microrganismos assimilaram os açúcares presentes no meio, devido a serem a única fonte de carbono. Porém, não foi possível identificar quais açúcares foram consumidos. As leveduras utilizam preferencialmente a via das pentoses, utilizando especificamente a xilose para produzir metabólitos secundários. Este pode ser um dos motivos pelo qual o melaço de soja teve alto desempenho durante a fermentação (Joshi-Navare et al., 2014; Bhaumik et al., 2020).

3.5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos ao longo desta pesquisa é possível afirmar que o melão de soja pode ser utilizado como substrato alternativo para produção de biossurfactante. Os microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos (*Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa*) foram capazes de produzir biossurfactantes e emulsionaram diferentes fontes hidrofóbicas, como óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel, além de reduzir a tensão superficial. As condições otimizadas para ambas cepas foram melão diluído, temperatura de 50°C, rotação de 200 rpm, ausência de fonte hidrofóbica e de suplementação química. Ainda que diferentes estudos já tenham abordado a produção de biossurfactantes por *Rhodotorula* a partir de substratos de baixo custo, até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho focado no aproveitamento do melão de soja. O ineditismo desta pesquisa é ressaltado ainda pelo uso de *Psychrobacter* sp. para este fim, dado que não foram encontradas outras referências que tenham investigado a produção de biossurfactantes a partir desta cepa, utilizando substrato de baixo custo. Desta forma, em estudos futuros, estes microrganismos podem ser considerados candidatos promissores para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos e bioprodutos visando diferentes aplicações.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, S. B. P. *et al.* Valorization of Soybean Molasses as Fermentation Substrate for the Production of Microbial Exocellular β -Glucan. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 8, p. 2149–2160, 2020. DOI 10.1007/s10924-020-01758-z.
- AL-BAHRY, S. N. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.01.006.
- ALMEIDA, N. H.; NOHAMA, P. Proposal of methodology and test protocol for evaluating and qualifying pH measuring devices. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. spe, p. 25–30, 2006. DOI 10.1590/s1516-89132006000200005.
- ARAÚJO, S. C. S. *et al.* MBSP1: a biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 28 Jan. 2020. DOI 10.1038/s41598-020-58330-x.
- ARIFIYANTO, A. *et al.* Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101513, 2020. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101513.
- ARORA, Jayati *et al.* Surfactant pollution, an emerging threat to ecosystem: Approaches for effective bacterial degradation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1229-1244, 2022.
- BARAKAT, K. M. *et al.* Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 3, p. 205–211, 2017. DOI 10.1016/j.ejar.2017.09.001.
- BISELLI, Andreas *et al.* Development, evaluation, and optimisation of downstream process concepts for rhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids. **Separation and Purification Technology**, v. 250, p. 117031, 2020.
- BHAUMIK, Moumita *et al.* Production, partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, p. 1747-1759, 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 911–917, 1959. DOI 10.1139/y59-099.

BUJAK, T. *et al.* Role of macromolecules in the safety of use of body wash cosmetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 497–503, 2015. DOI 10.1016/j.colsurfb.2015.07.051.

CHENG, C. *et al.* Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 166–174, 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2016.10.042.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987. DOI 10.1128/aem.53.2.224-229.1987.

DAERR, A.; MOGNE, A. Pendent_Drop: An ImageJ Plugin to Measure the Surface Tension from an Image of a Pendent Drop. **Journal of Open Research Software**, v. 4, n. 1, p. 3, 28 2016. DOI 10.5334/jors.97.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 233–240, 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.03.093.

DE MELLO, B. S. *et al.* Biological Degradation of Soybean Molasses by Modified Anaerobic–Aerobic Baffled Reactor. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 1, p. 673–682, 2023. DOI 10.1007/s12155-022-10458-6.

DONG, J. *et al.* Butanol Production from Soybean Hull and Soy Molasses by Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. **ACS Symposium Series**, Washington, DC, , p. 25–41, 2014. DOI 10.1021/bk-2014-1178.ch002.

DOS REMEDIOS ARAÚJO VIEIRA NETA, M. *et al.* Potential of acid-hydrolysed brewer's spent grain as substrate for biosurfactant production by *Rhodotorula mucilaginosa* LBP5 oleaginous yeast. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023. DOI 10.1007/s13399-023-03837-2.

GIOVANELLA, P. *et al.* Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 121024, 2020. DOI 10.1016/j.jhazmat.2019.121024.

HECK, M. A. *et al.* Medium optimization for biomass production of three peat moss (*Sphagnum* L.) species using fractional factorial design and response surface methodology. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100729, 2021. DOI 10.1016/j.biteb.2021.100729.

HUDSON, M. J. *et al.* Relationship of CDC group EO-2 and psychrobacter immobilis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1907–1910, 1987. DOI 10.1128/jcm.25.10.1907-1910.1987.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL), I. A. L. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 2008.

IBRAHIM, H. M. M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 27, n. 1, p. 21–29, 2018. DOI 10.1016/j.ejpe.2016.12.005.

IBRAHIM, M. L. *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28–34, 2013. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.11.012.

JOSHI-NAVARE, Kasturi; SINGH, Pradeep Kumar; PRABHUNE, Asmita A. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 8, p. 1070–1079, 2014.

KAWAHARA, H. *et al.* Stabilization of Astaxanthin by A Novel Biosurfactant Produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 1, p. 21–28, 2013. DOI 10.4265/bio.18.21.

KAZEMZADEH, S. *et al.* Production of surface-active sophorolipid biosurfactant and crude oil degradability by novel *Rhodotorula mucilaginosa* strain SKF2. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 25, n. 4, p. 439–454, 2022. DOI 10.1002/jsde.12572.

KITAMOTO, D. *et al.* Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 37–40, 1990. DOI 10.1271/bbb1961.54.37.

KOSARIC, Naim; SUKAN, Fazilet Vardar (Ed.). **Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics**. CRC press, 2014.

LAZARO, C. Z. *et al.* Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 16, p. 11691–11700, 2012. DOI 10.1016/j.ijhydene.2012.05.088.

LEBLANC, J. G. *et al.* Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 432–440, 2004.

LEITÃO, A. Economia Circular: Uma Nova Filosofia de Gestão Para o Séc. XXI. **Portuguese Journal of Finance, Management and Accounting**, v. 1, n. 2, 2015.

MARCELINO, P. R. F. *et al.* Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 212–223, 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.12.001.

MARKANDE, A. R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021. DOI 10.1016/j.biortech.2021.124963.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI 10.1021/ac60147a030.

MOURA, J. B. *et al.* Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 16, 2021. DOI 10.1093/femsle/fnab105.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101609, 2020. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101609.

PANDA, S. K.; MAITI, S. K. An approach for simultaneous detoxification and increment of cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* using rice straw. **Energy Sources, Part**

A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, v. 41, n. 22, p. 2691–2703, 2019. DOI 10.1080/15567036.2019.1568641.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, n. 1, p. 65–68, 2003. DOI 10.1007/s11743-003-0250-9.

REBELLO, S. *et al.* Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 2, p. 275–287, 2014. DOI 10.1007/s10311-014-0466-2.

RICCARDI, C. *et al.* Genome analysis of a new biosurfactants source: The Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. TAE2020. **Marine Genomics**, v. 61, p. 100922, 2022. DOI 10.1016/j.margen.2021.100922.

RIKALOVIC, M. *et al.* Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 279–304, 2015. DOI 10.2298/jsc140627096r.

RODRIGUES, B. C. G. *et al.* Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105226, 2021. DOI 10.1016/j.jece.2021.105226.

ROMÃO, B. B. *et al.* Ethanol Production from Hydrolyzed Soybean Molasses. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 4, p. 2310–2316, 2012. DOI 10.1021/ef201908j.

SAISA-ARD, K. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 36, n. 2, 2014.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Overview of extremophiles. In: **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**. Academic Press, 2020.

SANCHETI, A. *et al.* Factors influencing the enzymatic hydrolysis of soy molasses into fermentation feedstock. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 110302, 2023. DOI 10.1016/j.enzmictec.2023.110302.

SHAH, Nikhil *et al.* Biosurfactant: types, detection methods, importance and applications. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 5-10, 2016.

SHARMA, S. *et al.* Production of novel rhamnolipids via biodegradation of waste cooking oil using *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7815. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 301–312, 2019. DOI 10.1007/s10532-019-09874-x.

SHARMA, S.; PANDEY, L. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123261, 2020. DOI 10.1016/j.biortech.2020.123261.

SILVA, E. J. *et al.* Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 36–41, 2014. DOI 10.1016/j.colsurfb.2014.02.012.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008. DOI 10.1016/j.biortech.2008.03.037

SOBRINO-FIGUEROA, A. Toxic effect of commercial detergents on organisms from different trophic levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 13283–13291, 2018.

STYCZYNSKI, M. *et al.* Application of Psychrotolerant Antarctic Bacteria and Their Metabolites as Efficient Plant Growth Promoting Agents. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. DOI 10.3389/fbioe.2022.772891

TANIMURA, A. *et al.* Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 230–235, 2014. DOI 10.1016/j.biortech.2013.11.086.

TRUDGEON, B. *et al.* Low-Temperature Biosurfactants from Polar Microbes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1183, 2020. DOI 10.3390/microorganisms8081183.

VALDES, Constanza; GILLESPIE, Jeffrey; DOHLMAN, Erik. **Soybean Production, Marketing Costs, and Export Competitiveness in Brazil and the United States**. 2023.

VIEIRA, Isabela Maria Monteiro *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021.

VIGNESHWARAN, C. *et al.* Production optimization, purification and characterization of lipopeptide biosurfactant obtained from *Brevibacillus* sp. AVN13. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104867, 2021. DOI 10.1016/j.jece.2020.104867.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1996. DOI: doi.org/10.1007/BF00056425

YOUSSEF, N. H. *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004. DOI 10.1016/j.mimet.2003.11.001.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do desenvolvimento desta pesquisa foi possível concluir que:

- Painéis fotovoltaicos podem ser usados como ambiente antrópico extremo para bioprospecção de microrganismos de interesse industriais.
- Dentre as cepas escolhidas, foi possível observar que *Kocuria* sp. e *Gordonia* sp. também possuíam capacidade de produzir biossurfactante, no entanto *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa* apresentaram resultados mais promissores.
- O melaço de soja diluído pode ser um substrato para a produção de biossurfactantes sem necessidade de suplementação química e pré-tratamento.
- *Psychrobacter* sp. e *R. mucilaginosa* foram capazes de emulsionar diferentes óleos e reduzir a tensão superficial.
- Os resultados da otimização demonstraram que os melhores índices de emulsão e tensão superficial foram obtidos nas condições extremas do planejamento (50°C e 200 rpm).
- São poucos os estudos relacionando a produção de biossurfactante pelo gênero *Psychrobacter* sp. com substratos de baixo custo. Isso representa o potencial inovador desta pesquisa. Destaca-se neste trabalho o melaço de soja, resíduo rico em açúcares e que ainda, segundo literatura consultada, não foi utilizado para a produção de biossurfactantes por estes gêneros.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, S. *et al.* Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81–90, 2018. DOI 10.1016/j.biori.2018.09.001.
- AL-BAHRY, S. N. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.01.006.
- ASHISH; DAS, M. D. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, p. 40–48, 2018. DOI 10.1016/j.petrol.2018.06.034.
- BOTTOS, E. M. *et al.* Transcriptomic response of *Gordonia* sp. strain NB4-1Y when provided with 6:2 fluorotelomer sulfonamidoalkyl betaine or 6:2 fluorotelomer sulfonate as sole sulfur source. **Biodegradation**, v. 31, n. 4–6, p. 407–422, 2020. DOI 10.1007/s10532-020-09917-8.
- CHAVES, F. S. *et al.* Biosurfactant production by Antarctic-derived yeasts in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 6, p. 5295–5305, 2021. DOI 10.1007/s13399-021-01578-8.
- CHENG, C. *et al.* Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 166–174, 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2016.10.042.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Boletim da safra de grãos – safra 2022/23**. Brasil, 2023

DATTA, P. *et al.* Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 195, p. 107612, 2020. DOI 10.1016/j.petrol.2020.107612.

DE LEMOS, E. A. *et al.* The role and potential biotechnological applications of biosurfactants and bioemulsifiers produced by psychrophilic/psychrotolerant bacteria. **Polar Biology**, v. 46, n. 5, p. 397–407, 2023. DOI 10.1007/s00300-023-03139-3.

DE VRIEZE, J. *et al.* Co-digestion of molasses or kitchen waste with high-rate activated sludge results in a diverse microbial community with stable methane production. **Journal of Environmental Management**, v. 152, p. 75–82, 2015. DOI 10.1016/j.jenvman.2015.01.029.

FOUILLAUD, M.; DUFOSSÉ, L. Microbial Secondary Metabolism and Biotechnology. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 123, 2022. DOI 10.3390/microorganisms10010123.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7563–7577, 2013. DOI 10.1007/s00253-013-5046-z.

LOETO, D. *et al.* Biosurfactant production by halophilic yeasts isolated from extreme environments in Botswana. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 20, 2021. DOI 10.1093/femsle/fnab146.

LOMAN, A. A.; JU, L.-K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1046–1057, 2016. DOI 10.1016/j.procbio.2016.04.011.

MOURA, J. B. *et al.* Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 16, 2021. DOI 10.1093/femsle/fnab105.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101609, 2020. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101609.

PANJIAR, N. *et al.* Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. **Science of The Total Environment**, v. 729, p. 138933, 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.138933.

QI, P. *et al.* Demulsification and bio-souring control of alkaline-surfactant-polymer flooding produced water by *Gordonia* sp. TD-4. **Separation and Purification Technology**, v. 263, p. 118359, 2021. DOI 10.1016/j.seppur.2021.118359.

SARAFIN, Y. *et al.* Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2014. DOI 10.1016/j.sjbs.2014.01.001.

SHARMA, S.; PANDEY, L. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123261, Jul. 2020. DOI 10.1016/j.biortech.2020.123261.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008. DOI 10.1016/j.biortech.2008.03.037.

SU, X. *et al.* Whole-genome sequencing of an acidophilic *Rhodotorula* sp. ZM1 and its phenol-degrading capability under acidic conditions. **Chemosphere**, v. 232, p. 76–86, 2019. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.05.195.

TANNER, K. *et al.* Bioprospecting the Solar Panel Microbiome: High-Throughput Screening for Antioxidant Bacteria in a *Caenorhabditis elegans* Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.00986.

TKAVC, R. *et al.* Prospects for Fungal Bioremediation of Acidic Radioactive Waste Sites: Characterization and Genome Sequence of *Rhodotorula taiwanensis* MD1149. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2018. DOI 10.3389/fmicb.2017.02528.

ZARGAR, A. N. *et al.* Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100. **PLOS ONE**, v. 17, n. 4, p. e0264202, 2022. DOI 10.1371/journal.pone.0264202.

ZHANG, B. *et al.* A novel UASB–MFC–BAF integrated system for high strength molasses wastewater treatment and bioelectricity generation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5687–5693, Dec. 2009. DOI 10.1016/j.biortech.2009.06.045

APÊNDICE – A

Tabela 1 – Parâmetros utilizados na otimização e índice de emulsão (%E₂₄) e tensão superficial (mN.m⁻¹) para a bactéria *Psychrobacter* sp.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Psychrobacter</i> sp.					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
1	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	16,08	0	30,61	17,23	67,78	10,3
2	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	25,78	0	29,43	11,99	54,28	11,68
3	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	14,39	0	33,73	0	68,44	13,22
4	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	24,02	0	33,74	20,95	60,87	10,56
5	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	14,34	0	21,97	0	60,45	12,44
6	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	22,78	2,43	70,61	5,93
7	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	22,39	35,66	29,15	67,42	11,1
8	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	29,1	33,33	30,63	13,46	68,4	9,56
9	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	26,5	8,21	17,91	18,91	65,07	19,11
10	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	9,09	0	7,35	12,99	65,37	9,31
11	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	0	0	69,85	2,49
12	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	12,13	0	60,61	5,8
13	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	14,34	0	27,38	0	69,06	9,02
14	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	31,91	3,77	61,63	7,24
15	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	9,89	0	26,56	0	68,21	5,44
16	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	9,3	0	62,23	8,23
17	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	11,97	0	62,73	12,57
18	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	9,35	0	11,48	0	65,38	6,69
19	2	50	200	0	Não	1 - Diluído	92,17	61,96	88,24	95,99	34,86	11,34
20	2	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	60,12	5,38
21	2	50	200	5	Sim	1 - Diluído	88,5	72,29	87,27	96,98	40,89	6,31

Tabela 1 – Continuação.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Psychrobacter</i> sp.					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
22	2	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	16,49	0	0	0	67,37	10,46
23	3	50	200	0	Não	1 - Diluído	96,92	86,96	85,04	96,02	34,23	10,87
24	3	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	7,6	0	0	0	64,38	6,2
25	3	50	200	5	Sim	1 - Diluído	89,18	77,91	83,33	95,91	64,88	9,98
26	3	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	14,96	0	5,67	0	60,61	11,92
27	1	50	200	0	Não	1 - Diluído	92,23	74,38	83,71	93,89	33,88	12,18
28	1	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	53,73	4,07
29	1	50	200	5	Sim	1 - Diluído	89,18	79,01	83,71	91,14	45,9	11,26
30	1	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	6,18	28,18	10,04	0	64,25	11,78
31	2	15	200	5	Não	1 - Diluído	88,1	28,86	46,95	32,4	49,56	22,63
32	2	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	26,42	0	0	0	59,11	13,21
33	2	15	200	0	Sim	1 - Diluído	50	32,64	72,82	42,8	31,82	18,47
34	2	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	53,19	49,19
35	3	15	200	5	Não	1 - Diluído	72,08	20,71	48,33	16,79	40,72	28,7
36	3	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	27,53	0	0	0	55,53	13,21
37	3	15	200	0	Sim	1 - Diluído	86,16	79,92	69,37	76,95	26,97	61,48
38	3	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	24,25	0	56,65	26,52
39	1	15	200	5	Não	1 - Diluído	38,06	16,2	18,86	15,21	42,1	26,81
40	1	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	13,9	0	0	0	56,54	0,02
41	1	15	200	0	Sim	1 - Diluído	53,11	41,46	70,77	64,77	25,76	34,22
42	1	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	49,02	28,81
43	2	15	100	0	Não	1 - Diluído	48,83	46,13	71,94	74,29	28,38	51,03
44	2	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	51,27	14,03
45	2	15	100	5	Sim	1 - Diluído	77,67	13,31	34,05	45,56	46,21	12,69

Tabela 1 – Continuação.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Psychrobacter</i> sp.					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
46	2	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	58,73	15,63
47	3	15	100	0	Não	1 - Diluído	81,75	58,47	43,31	71,18	23,32	56,98
48	3	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	56,03	20,39
49	3	15	100	5	Sim	1 - Diluído	76,05	37,31	0	54,38	40,2	21,92
50	3	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	61,55	19,4
51	1	15	100	0	Não	1 - Diluído	65,03	58,7	12,46	79,85	25,81	40,54
52	1	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	5,4	0	0	0	57,91	17,11
53	1	15	100	5	Sim	1 - Diluído	91,25	41,83	54,96	87,07	41,71	10,59
54	1	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	68,69	0	0	0	62,92	16,7
55	2	50	100	5	Não	1 - Diluído	94,68	32,04	52,05	73,78	40,54	12,1
56	2	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	9,26	8,85	0	0	60,02	9,39
57	2	50	100	0	Sim	1 - Diluído	86,21	52,51	93,75	78,28	33,46	23,9
58	2	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	51,49	24,25
59	3	50	100	5	Não	1 - Diluído	85,23	0	7,64	20,24	41,29	6,19
60	3	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	58,9	8,99
61	3	50	100	0	Sim	1 - Diluído	76,21	72,83	57,19	64,81	27,86	113,25
62	3	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	60,46	22,45
63	1	50	100	5	Não	1 - Diluído	45,25	33,6	13,55	41,94	32,78	16,1
64	1	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	57,41	12,22
65	1	50	100	0	Sim	1 - Diluído	54,39	45,42	85,17	73,74	31,26	1,1
66	1	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	57,85	19,65
					Controle		71,48	0	0	0	65,21	3,44
					Controle		71,79	0	0	0	66,25	3,99
					Controle		70,18	0	0	0	65,18	1,27

Tabela 2 – Parâmetros utilizados na otimização e índice de emulsão (%E₂₄) e tensão superficial (mN.m⁻¹) para a levedura *R. mucilaginosa*.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
1	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	14,08	7,33	62,73	11,7
2	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	28,51	7,88	61,09	7,51
3	2	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	15,83	44,81	8,7	58,81	11,76
4	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	17,09	0	35,58	0	55,79	12,26
5	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	14,17	0	37,6	12,4	56,3	18,1
6	2	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	23,19	15,08	39,43	0	52,99	14,7
7	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	12,17	31,43	0	62,25	6,19
8	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	15,52	0	64,41	5,6
9	3	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	30,86	16,74	57,25	16,86
10	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	25,74	16,93	9,27	58,05	22,18
11	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	8,87	26,12	37,85	11,97	57,76	13,69
12	3	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	3,67	21,05	51,27	28,43
13	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	31,58	8,15	55,24	13,62
14	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	5,08	0	57,92	14,59
15	1	32,5	150	2,5	Não	2 - Clarificado	0	0	25,58	17,03	58,48	13,22
16	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	26,83	23,55	58,33	28,98
17	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	0	7,02	0	54,96	23,12
18	1	32,5	150	2,5	Sim	2 - Clarificado	0	19,1	8,16	0	57,97	26,88
19	2	50	200	0	Não	1 - Diluído	48,06	38,65	37,7	88,14	35,91	14,56
20	2	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	16,29	0	37,31	14,64
21	2	50	200	5	Sim	1 - Diluído	68,46	25,98	23,65	16,47	41,55	25,83
22	2	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	38,25	0	60,89	15,93
23	3	50	200	0	Não	1 - Diluído	95,42	64,34	42,11	91,3	35,3	16,47

Tabela 2 – Continuação.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
24	3	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	9,09	0	59,91	11
25	3	50	200	5	Sim	1 - Diluído	85,56	42,69	38,4	41,53	34,35	6,96
26	3	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	38,3	26,05
27	1	50	200	0	Não	1 - Diluído	72,66	71,64	81,93	85,13	31,61	27,84
28	1	50	200	5	Não	3 - Hidrolisado	84,59	0	0	0	49,65	8,09
29	1	50	200	5	Sim	1 - Diluído	76,95	33,58	40,83	39,37	43,07	8,41
30	1	50	200	0	Sim	3 - Hidrolisado	7,09	18,75	36,29	0	56,82	36,91
31	2	15	200	5	Não	1 - Diluído	43,51	45,95	35,79	12,79	42,27	23,48
32	2	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	0	24,81	0	28,46	51,97	19,13
33	2	15	200	0	Sim	1 - Diluído	38,11	0	0	0	47,03	32,21
34	2	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	51,02	14,39
35	3	15	200	5	Não	1 - Diluído	53,09	33,33	10,14	9,12	46,79	17,62
36	3	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	0	20,83	44,25	25,9	54,76	18,39
37	3	15	200	0	Sim	1 - Diluído	21,43	32,31	0	0	36,74	33,38
38	3	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	51,91	24,46
39	1	15	200	5	Não	1 - Diluído	51,52	0	44,1	37,6	46,31	6,55
40	1	15	200	0	Não	3 - Hidrolisado	0	27,6	43,68	32,3	55,52	19,5
41	1	15	200	0	Sim	1 - Diluído	27,5	67,37	0	0	43,55	64,73
42	1	15	200	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	17,94	0	60,6	12,06
43	2	15	100	0	Não	1 - Diluído	61,67	57,45	70,4	65,81	28,52	36,43
44	2	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	60,16	13,18
45	2	15	100	5	Sim	1 - Diluído	75,97	65,98	20,91	7,89	41,12	28,54

Tabela 2 – Continuação.

Ordem	Blocos	Temperatura	Rotação	Fonte Hidrofóbica	Suplementação Química	Melaço de Soja	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					
							Óleo de Soja (%E ₂₄)	Óleo de Motor (%E ₂₄)	Querosene (%E ₂₄)	Óleo Diesel (%E ₂₄)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹)
46	2	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	9,24	9,43	0	52,94	35,83
47	3	15	100	0	Não	1 - Diluído	58,1	56,83	82,33	74,49	29,35	13,51
48	3	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	44,64	17,96	0	0	60,84	11,91
49	3	15	100	5	Sim	1 - Diluído	77,82	31,47	0	6,06	39,66	27
50	3	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	18,67	0	0	47,86	32,74
51	1	15	100	0	Não	1 - Diluído	76,22	60,69	0	0	39,6	25,49
52	1	15	100	5	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	8,64	58,87	16,36
53	1	15	100	5	Sim	1 - Diluído	77,51	59,66	0	12,18	37,22	28,8
54	1	15	100	0	Sim	3 - Hidrolisado	0	18,18	0	0	50,87	36,37
55	2	50	100	5	Não	1 - Diluído	91,87	0	0	32,28	53,87	1,53
56	2	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	35,88	0	0	0	61,15	13,69
57	2	50	100	0	Sim	1 - Diluído	22,07	36,25	0	31,1	33,94	27,26
58	2	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	60,29	18,23
59	3	50	100	5	Não	1 - Diluído	83,57	14,39	32,53	10,12	45,77	22,86
60	3	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	63,15	11,63
61	3	50	100	0	Sim	1 - Diluído	89,47	0	0	65,59	32,79	33,53
62	3	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	40	0	0	54,2	16,04
63	1	50	100	5	Não	1 - Diluído	85,17	49,8	81,88	45,87	35,42	69,05
64	1	50	100	0	Não	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	55,13	32,75
65	1	50	100	0	Sim	1 - Diluído	90,03	82,2	0	0	35,68	28,89
66	1	50	100	5	Sim	3 - Hidrolisado	0	0	0	0	61,24	25,27
					Controle		16,67	0	43,29	0	53,62	4,79
					Controle		16,42	0	13,22	12,4	65,1	4,93
					Controle		63,57	0	33,72	13,75	60,95	3,9