



Evaluación del hongo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 en la producción de biosurfactante usando aceite post fritura y licor de lavado de maíz

Avaliação do fungo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 na produção de biossurfactante usando óleo pós-fritura e licor de lavagem de milho

Elizandro Lima Freitas

Universidad Estatal de Paraíba, Brasil
Correo electrónico: elizandrolimaelf@hotmail.com

Sonally de Oliveira Lima

Universidad Estatal de Paraíba, Brasil
Correo electrónico: sonally.lima@hotmail.com

Dayana Montero-Rodríguez

Universidad Católica de Pernambuco, Brasil
Correo electrónico: dayanamontero87@gmail.com

Rosileide Fontenele da Silva Andrade

Universidad Católica de Pernambuco, Brasil
Correo electrónico: rosileide.andrade@unicap.br

Galba Maria de Campos-Takaki

Universidad Católica de Pernambuco, Brasil
Correo electrónico: galba.takaki@unicap.br

Hélvia Walewska Casullo de Araújo

Universidad Estatal de Paraíba, Brasil
Correo electrónico: hwcasullo@gmail.com

RESUMEN

El presente trabajo evaluó el potencial biotecnológico del hongo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040, aislado del suelo del Estado de Pernambuco, para la producción de biosurfactante usando residuos agroindustriales como fuentes alternativas de carbono y nitrógeno. Las fermentaciones se realizaron durante 144 h, 28°C y 150 rpm, en medios consistidos por diferentes concentraciones de aceite post fritura y licor de lavado de maíz, de acuerdo a un diseño factorial 2². Los efectos de los sustratos en la producción del surfactante se evaluaron mediante análisis estadístico, utilizando la tensión superficial como variable de respuesta. Las propiedades emulsionantes y dispersantes del biosurfactante se investigaron mediante el índice de emulsificación (IE24) y el ensayo de dispersión, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que *P. sclerotiorum* fue capaz de producir un compuesto surfactivo en presencia de sustratos renovables, observándose la mayor reducción de la tensión superficial (de 72,0 a 42,77 mN/m) en la condición 2 del diseño (medium compuesto por 3% aceite post fritura y 5% licor de lavado de maíz). Aunque el biosurfactante producido en esta condición no mostró buenas propiedades emulsantes, demostró excelentes propiedades dispersantes, con un área de dispersión de aceite (ADA) de 44,18 cm². El diagrama de Pareto demostró la influencia significativa de la interacción de los residuos en la producción del biosurfactante, constituyendo sustratos

alternativos y de bajo costo, que hacen que el bioproceso sea económico y, por lo tanto, atractivo para diferentes industrias.

Palabras clave: Surfactante microbiano, Residuos agroindustriales, Diseño factorial, Tensión superficial, Área de dispersión de aceptación.

1 INTRODUCCIÓN

El petróleo y sus derivados han traído grandes avances a la sociedad, principalmente modificando la forma de producción, generación de energía, transporte y permitiendo el descubrimiento de nuevas sustancias químicas, que son ampliamente utilizadas en procesos industriales (Sousa, et al., 2020). Los tensioactivos sintéticos tienen origen petrolero y comprenden un grupo de moléculas anfifílicas que se dividen en las interfaces de sustancias inmiscibles, disminuyendo así la tensión superficial entre estas sustancias con diferentes polaridades (Felipe, et al., 2017). Esta característica permite una diversidad de aplicaciones industriales, ya sea en la remediación de petróleo en suelo o agua, en la formulación de medicamentos, productos de higiene y alimentos (Santos, 2019).

Sin embargo, estos tensioactivos sintéticos tienen efectos adversos sobre las propiedades estructurales y funcionales de las membranas celulares de los organismos vivos, dañando así los ecosistemas marinos y terrestres, debido a su toxicidad y recalcitrancia (Sena, 2014). En este sentido, la legislación ambiental ha buscado desarrollar alternativas eficientes y de bajo costo que generen el menor impacto posible en el medio ambiente (Nitschke & Pastore, 2002). Entre ellos, destacamos el uso de biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos, de gran interés industrial, ya que tienen propiedades emulsionantes, detergencia, solubilización, dispersión de fase, reducción de la tensión superficial, entre otros. otros (Sperb, et al., 2015).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad del hongo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 para producir biosurfactante utilizando como sustratos alternativos aceite post-fritura y milhocina.



2 METODOLOGÍA

2.1 PREPARACIÓN DE MICROORGANISMOS E INÓCULOS

El microorganismo utilizado fue el hongo filamentoso *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040, aislado del suelo de la región semiárida de Pernambuco y guardado en la Colección de Cultivos del Centro de Investigación en Ciencias Ambientales y Biotecnología (NPCIAMB), de la Universidad Católica de Pernambuco (UNICAP), inscrita en la Colección de la Federación Mundial para la Cultura (WFCC). El cultivo se mantuvo en agar dextrosa patata (BDA) en medio a 5°C. Para la preparación del inóculo, el hongo se cultivó en placas de Petri que contenían BDA a 28°C durante 96 h, y después del crecimiento, se retiraron 40 discos del nuevo micelio y se utilizaron para inocular los medios de producción.

2.2 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

En la formulación de los medios de producción, se utilizaron los residuos de aceite post-fritura (OPF), de una panadería, ubicada en la ciudad de Barra de Santana – PB, y el maíz, proporcionado por la industria procesadora de maíz, ubicada en la ciudad de Cabo de Santo Agostinho-PE.

2.3 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE

La producción de biosurfactante se realizó en viales de Erlenmeyer con una capacidad de 250 ml, conteniendo 100 ml de medio constituido por diferentes concentraciones de residuos agroindustriales, según un diseño factorial 2². Los medios fueron sometidos a esterilización en autoclave y tras enfriarse a temperatura ambiente, fueron inoculados con 40 discos de *P. sclerotiorum* UCP 1040 cultivados en BDA. La fermentación se produjo bajo agitación de 150 rpm y temperatura de 28°C, durante 144 h. La biomasa producida se separó de los líquidos metabólicos por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min y luego se filtró utilizando nylon serigrafiado (malla 120). Se utilizaron fluidos metabólicos libres de células para determinar la tensión superficial y el índice de emulsificación, así como para el ensayo de dispersión de aceite de motor quemado, como se describe más adelante.

2.4 PLANIFICACIÓN FACTORIAL

Para investigar los efectos de las concentraciones de residuos agroindustriales en la producción de biosurfactante, se utilizó un diseño factorial 2^2 , considerando la tensión superficial como respuesta o variable dependiente. Cada variable independiente se investigó en tres niveles, mínimo (-1), central (0) y máximo (+1), como se muestra en la Tabla 1. Se realizaron 7 ensayos experimentales y los datos obtenidos fueron analizados por el software Statistica®, versión 12.0 (StatSoft Inc., USA), probando la significación de los resultados ($p < 0.05$).

Tabla 1 - Variables y niveles utilizados en el diseño factorial 2^2 para investigar la producción de biosurfactante mediante *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040.

	Niveles variables		
	-1	0	+1
Acceptar post-freír (% v /v)	1	2	3

Fuente: Autores.

2.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

La tensión superficial de los fluidos metabólicos se determinó por el método del peso de las gotas, utilizando una bureta graduada de 50 ml suspendida con la ayuda de un soporte para el conteo de 20 gotas en un vaso de precipitados de 100 ml para determinar el peso y el radio de esta caída y así obtener el factor de corrección correspondiente (Behring et al., 2004). La tensión superficial fue calculada por la ley de Tate, usando la ecuación 1:

$$(Ec.1) \quad \gamma = \frac{m \cdot g}{2\pi \cdot r \cdot f} = \frac{V \cdot \rho \cdot g}{2\pi \cdot r \cdot f}$$

Este método se basa en la formación de la gota y en el momento exacto del desprendimiento de la gota, la fuerza ejercida por el peso de la gota ($m \cdot g$) se equilibra con la tensión superficial (γ) multiplicada por la circunferencia ($2\pi \cdot r$) de la gota formada. Con esto, la tensión superficial se puede determinar utilizando la masa de solo una gota del líquido analizado, o por el volumen de la gota y la densidad del líquido (Behring, et al., 2004).

2.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN (IE24)

El índice de emulsificación (IE24) se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Cooper & Goldenberg (1987), utilizando los líquidos metabólicos de los ensayos de diseño factorial y los sustratos hidrófobos aceite de soja, aceite de coco, OPF y aceite de motor quemado. El este se realizó por triplicado en tubos de ensayo que contenían 2 ml de líquido metabólico y 1 ml de compuesto hidrófobo, que se agitaron en vórtice durante 2 min a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Después de 24 h, se visualizaron las emulsiones y se determinó IE24 a través de la ecuación 2, propuesta por Wei et al., (2005):

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

donde: H_e es la altura de la emulsión y H_t es la altura total del líquido.

2.7 PRUEBA DE DISPERSIÓN

La prueba de dispersión se realizó utilizando el fluido metabólico de la mejor condición de diseño factorial (menor valor de tensión superficial). Para esto, se transfirieron 15 ml de agua destilada a una placa de Petri (9,5 cm de diámetro), seguida de la adición de 1 ml de aceite de motor quemado en la superficie de la capa de agua. Luego, se agregaron 100 μl del líquido metabólico al centro de la película de aceite (Youssef, et al., 2004). La capacidad de dispersión del biosurfactante se demostró mediante la disolución del aceite, lo que resultó en la formación de una zona clara en el centro de la película de aceite, cuyo diámetro se midió. El área de dispersión de petróleo (ADO) se calculó mediante la ecuación 3 y se expresó en cm^2 .

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$\text{ADO} = \pi_x r^2 \quad (\text{eq. 3})$$

3.1 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE POR *PENICILLIUM SCLEROTIORUM* UCP 1040

Comúnmente los microorganismos considerados como productores prometedores de biosurfactantes son aquellos que reducen la tensión superficial del medio a 40 mN/m o menos. Sin embargo, varios estudios destacan que cualquier reducción en la tensión superficial > 20 mN / m por debajo de la tensión superficial del agua destilada (72 mN / m) se considera "buena" y, por lo tanto, es un biosurf. actante prometedor (Rahman, et al., 2019). En este contexto, se demostró que el hongo *P. sclerotiorum* UCP 1040 metaboliza milhocine y OPF y produce biosurfactante, reduciendo así la tensión superficial de los medios probados (Tabla 2).

Tabla 2 - Resultados de la tensión superficial obtenida por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 después de 144 h de cultivo en los medios de producción constituidos por residuos agroindustriales, según el diseño factorial 2 2.

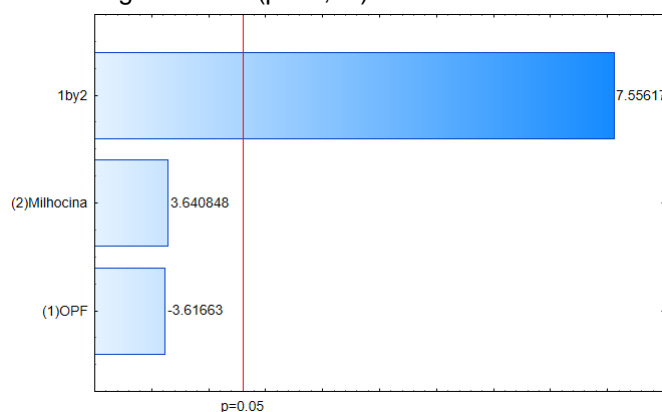
Condiciones	Aceite post-fritura	Milhocina	TS (mN/m)
1	-1	-1	56,61
2	+1	-1	42,77
3	-1	+1	51,76
4	+1	+1	56,64
5	0	0	44,56
6	0	0	45,19
7	0	0	46,95

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo como parámetro inicial la tensión superficial del agua (72 mN/m) obtenida por la ecuación 1, la cepa presentó el mejor resultado en la condición 2 del diseño factorial 2 2, en el medio constituido por 3% de OPF y 5% de milhocina, reduciendo la tensión a 42,77 mN/m. Anteriormente, algunos investigadores reportaron la producción de biosurfactantes por hongos que representan el género *Penicillium* (Luna-Velasco, et al., 2007; Gautam, et al., 2014; Cicatiello, et al., 2019; Sanches, et al., 2021). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios los medios de producción consistieron en fuentes convencionales de carbono y nitrógeno (glucosa, peptona, extracto de levadura, etc.), lo que a veces hace que sea costoso obtener estas biomoléculas. En este sentido, la reutilización de residuos de agro-industrial (OPF y maíz) como sustratos alternativos puede hacer que el proceso sea más económico (Andrade, et al., 2018; Mendonça, et al., 2021; Fonseca, et al., 2022). El diagrama de Pareto ilustrado en la Figura 1 demuestra el efecto significativo de la interacción de OPF y

milhocine en la tensión superficial del medio, verificando que ambos sustratos son efectivos para la producción de biosurfactante, como se informó previamente en la literatura (Marques, et al., 2019; Ferreira, et al., 2020; Candide, et al., 2022).

Figura 1 - Diagrama de Pareto obtenido del diseño factorial 2 x 2 utilizado para determinar la influencia de las variables independientes aceite post-fritura (1) y milhocine (2) sobre la tensión superficial en la producción de biosurfactante por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040. El punto en el que los efectos estimados son estadísticamente significativos ($p = 0,05$) se indica mediante el lino vertical rojo discontinuo.

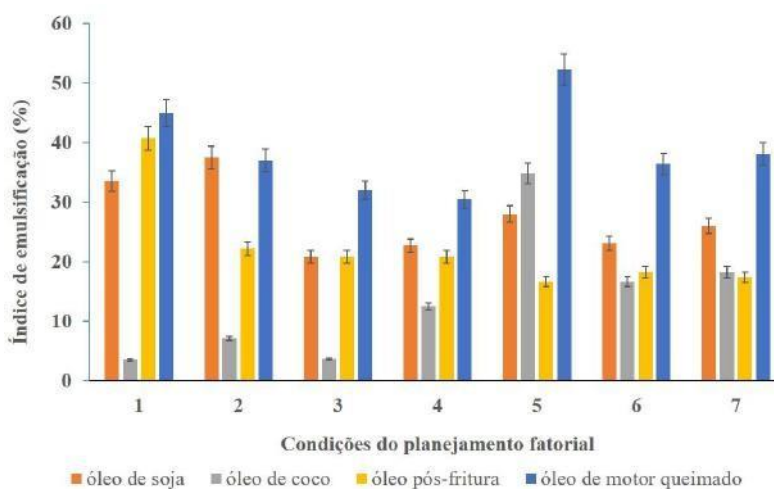


Fuente: Elaboración propia.

3.2 PROPIEDADES EMULSIONANTES

La determinación de IE 24 se ha utilizado a menudo para identificar biosurfactantes que se caracterizan por su excelente capacidad para estabilizar emulsiones (Andrade, et al., 2018; Pelé, et al., 2019; Santiago, et al., 2021). Este método se evalúa por la capacidad de mantener al menos el 50% del volumen original de la emulsión después de 24 horas de formación (Lima, et al., 2017). En este contexto, en este estudio se determinó el IE 24 utilizando el fluido metabólico de todas las condiciones de diseño factorial. De acuerdo con la Figura 2, los mejores resultados se verificaron con el aceite de motor quemado, confirmando que la capacidad de formar emulsiones estables depende no solo de las propiedades emulsionantes del biosurfactante, sino también del tipo de componente hidrofóbico utilizado en la prueba. Sin embargo, solo en la condición 5 se obtuvo IE24 por encima del 50% (52,2%), observando que no todos los biosurfactantes tienen buenas propiedades emulsionantes (Uzoigwe, et al., 2015; Rahman, et al., 2019).

Figura 2 - Índice de emulsificación obtenido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 después de 144 h de cultivo en los medios de producción constituidos por residuos agroindustriales, según el diseño factorial 2 2.

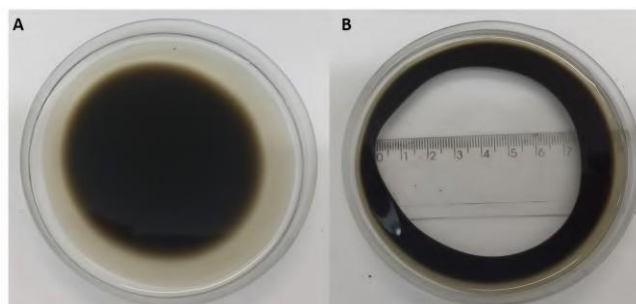


Fuente: Elaboración propia.

3.3 PRUEBA DE DISPERSIÓN

La prueba de dispersión se usa comúnmente para investigar las propiedades de dispersión de un biosurfactante, donde la aparición de una zona clara en el centro del aceite indica la presencia de surfactante, y el diámetro de la zona de luz está directamente correlacionado con la actividad del surfactante. Así, se ha comprobado que existe una relación lineal inversa de ADO con la tensión superficial, de forma que el aumento de la dispersión del aceite se correlaciona con la disminución de la tensión superficial (Youssef, et al., 2004; Rahman, et al., 2019). En este contexto, en el presente estudio la prueba de dispersión se realizó utilizando la condición 2 del diseño factorial, ya que obtuvo el valor más bajo de tensión superficial (42,77 mN/m).

Figura 3 - Prueba de dispersión de aceite de motor quemado utilizando biosurfactante producido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040. Visualización de la placa de Petri que contiene agua destilada y aceite de motor quemado antes (A) y después de (B) la aplicación del líquido metabólico de la condición 2 del diseño factorial 2 2.



Fuente: Elaboración propia.



La Figura 3 verificó la capacidad de *P. sclerotiorum* UCP 1040 para producir un biosurfactante con excelentes propiedades de dispersión, como lo indica la zona clara formada en la capa de aceite de motor quemado. El valor de ADO obtenido fue de 44,18 cm², superior a los reportados previamente para los biosurfactantes producidos por *P. esclerotiorum* UCP 1361 (33,15 cm²), *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 (32,15 cm²) y *Mucor circinelloides* UCP 0005 (38,62 cm²) (Andrade, et al., 2018; Truan, et al., 2020; Santiago, et al., 2021). Además, fue similar a la del detergente comercial (44,2 cm²) (Pelé, et al., 2019) y SDS (40,6 cm²) (Santiago, et al., 2021), corroborando el potencial de aplicación como agente dispersante, como alternativa a los tensioactivos químicos comercializados.

4 CONCLUSIÓN

Los impactos causados por sustancias hidrofóbicas al medio ambiente, especialmente el petróleo y sus derivados, perjudican el mantenimiento de los ecosistemas acuáticos y terrestres, así como los productos químicos utilizados para eliminar estos contaminantes, debido a su obstinación y toxicidad. En este contexto, el hongo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 presentó potencial biotecnológico para la producción de biomolécula surfactante a partir de la reutilización de residuos agroindustriales. El biosurfactante producido requirió una excelente dispersión, lo que sugiere una potencial aplicación en el sector ambiental, en la limpieza y descontaminación de ambientes impactados con petroderivados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Investigación en Ciencias Ambientales y Biotecnología (NPCIAMB) de la Universidad Católica de Pernambuco y a las agencias financiadoras CAPES, FAPESQPB y FACEPE.



REFERENCIAS

Andrade, R. F., Silva, T. A., Ribeaux, D. R., Rodriguez, D. M., Souza, A. F., Lima, M. A., ... & Campos-Takaki, G. M. (2018). Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 using renewable resources and its application in cotton fabric cleaning process. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018.

Behring, J. L., Lucas, M., Machado, C., & Barcellos, I. V. (2004). Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. *Quim. Nova*, 27(3), 492-495. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300021>

Cândido, T. R. S., Mendonça, R. S., Lins, U. M. B. L., Souza, A. F., Rodrigues, D. M., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. S. (2022). Production of biosurfactants by *Mucoralean* fungi isolated from Caatinga bioma soil using industrial waste as renewable substrates. *Society and Development*. 11(2) <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25332>

Cicatiello, P., Stanzione, I., Dardano, P., De Stefano, L., Birolo, L., De Chiaro, A., ... & Giardina, P. (2019). Characterization of a surface-active protein extracted from a marine strain of *Penicillium chrysogenum*. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3242.

Cooper D. G., & Goldenberg, B. G (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2), 224-229.

Felipe, L. O., & Dias, S. C. (2017). Surfactantes sintéticos e Biosurfactantes: Vantagens e desvantagens. *Química. nova escola. – São Paulo-SP, BR*, 39(3), 228-236. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>

Ferreira, I. N. S., Rodríguez, D. M., Campos-Takaki, G. M., & da Silva Andrade, R. F. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 47, 51-58.

Fonseca, T. C. S., de Souza, A. F., dos Santos, P. N., da Silva, P. H., Rodríguez, D. M., Costa, L. O., & Campos-Takaki, G. M. (2022). Sustainable production of biosurfactant by *Issatchenkia orientalis* UCP 1603 using renewable substrates. *Research, Society and Development*, 11(4), e16111427174-e16111427174.

Gautam, G., Mishra, V., Verma, P., Pandey, A. K., & Negi, S. (2014). A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(6), 1.

Lima, R. A., Andrade, R. F., Rodríguez, D. M., Araujo, H. W., Santos, V. P., & Campos-Takaki, G. M. (2017). Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. *African journal of microbiology research*, 11(6), 237-244.



Luna-Velasco, M. A., Esparza-García, F., Cañízares-Villanueva, R. O., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochemistry*, 42(3), 310-314.

Marques, N. S. A.A., de Lima, T. A., da Silva Andrade, R. F., Júnior, J. F. B., Okada, K., & Takaki, G. M. C. (2019). Lipopeptide biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP/WFCC 0001 applied in the removal of crude oil and engine oil from soil. *Acta Scientiarum. Technology*, 41, e38986-e38986.

Mendonça, R. S., Sá, A. V. P., Rosendo, L. A., dos Santos, R. A., do Amaral Marques, N. S. A., Souza, A. F., . . . & de Campos Takaki, G. M. (2021). Produção de biossurfactante e lipídeos por uma nova cepa de *Absidia cylindrospora* UCP 1301 isolada do solo da Caatinga usando subprodutos agroindustriais de baixo custo. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 8300-8313.

Nitscke, M., & Pastore, G. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química nova*. 25(5), 772-774. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

Pele, M. A., Ribeaux, D. R., Vieira, E. R., Souza, A. F., Luna, M. A., Rodríguez, D. M., ... & Campos-Takaki, G. M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 40-48.

Sanches, M. A., Luzeiro, I. G., Cortez, A. C. A., De Sousa, E. S., Albuquerque, P. M., Chopra, H. K., & De Souza, J. V. B. (2021). Production of biosurfactants by Ascomycetes. *International Journal of Microbiology*. doi.org/10.1155/2021/6669263

Santiago, M. G., Lins, U. M. D. B. L., de Campos Takaki, G. M., da Costa Filho, L. O., & da Silva Andrade, R. F. (2021). Produção de biossurfactante por *Mucor circinelloides* UCP 0005 usando novo meio de cultura formulado com cascas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) e milhocina. *Brazilian Journal of Development*, 7(5), 51292-51304.

Santos, S. F. M., Melo, A. L. M., Lima, A. O., Pereira, L. M. S., Santos, F. A., Medeiros, N. M., & Silva, M. G. B. (2018). Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. *Revista saúde e Ciência online*, 7(2), 413-425, <https://doi.org/10.35572/rsc.v7i2.126>

Santos, S. C. dos. (2022). Biossurfactantes: potenciais agentes biorremediadores. *Cadernos De Prospecção*, 12(5), 1531. <https://doi.org/10.9771/cp.v12i5.33191>

Sena, H. H. (2014). Produção de biossurfactante por fungos isolados do solo Amazônico. Dissertação (mestrado). Curso de Ciências farmacêutica. Universidade Federal do Amazonas, <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/4706>

Sperb, J. G. D., Costa, T. M., Vaz, D. A., Valle, J. A. B., Valle, R. C. S. C., Tavares, L. B. B. (2015). Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. *Engevista*, 17(3), 385-397. <https://doi.org/10.22409/engevista.v17i3>



Rahman, P. K., Mayat, A., Harvey, J. G. H., Randhawa, K. S., Relph, L. E., & Armstrong, M. C. (2019). Biosurfactants and bioemulsifiers from marine algae. In *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 169-188). Springer, Singapore.

Truan, L., Marques, N., Souza, A., Rubio-Ribeaux, D., Cine, A., Andrade, R., ... & Takaki, G. (2020). Sustainable biotransformation of barley and milk whey for biosurfactant production by *Penicillium sclerotiorum* UCP 1361. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 259-264.

Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., & Rahman, P. K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 245.

Velioglu, Z., & Urek, R.O. (2015). "Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems", *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 160-166. <https://doi.org/10.3906/biy-1406-44>

Wei, Y., Chou, C. & Chang, J. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. 27, 146-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.028>

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>