

UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA *CANDIDA TROPICALIS* A PARTIR DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS

D. G de ALMEIDA¹, R.C.F.S da SILVA¹, P. P. F. BRASILEIRO², J.M de LUNA², L. A. SARUBBO^{1,2}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO; FACEPE, Centro de Gestão de tecnologia e Inovação - CGTI.

² Universidade Católica de Pernambuco e Centro de Ciência e Tecnologia; CAPES, FACEPE, UNICAP, TERMOPE, CNPq, ANEEL.
E-mail para contato: darnebio@yahoo.br

RESUMO – Considerando a habilidade de bactérias e leveduras em produzir surfactantes atóxicos e biodegradáveis e a crescente preocupação da preservação ambiental, a produção de biossurfactantes por micro-organismos torna-se uma estratégia importante na obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente. Nesse sentido, o presente trabalho investigou a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* empregando resíduos industriais por meio de um planejamento experimental. Como resultado, foi observado que a condição contendo 2,5% de melaço, 2,5% de milhocina, 2,5% de óleo de canola residual, sob agitação de 250 rpm e com 2% de tamanho de inóculo foi a mais indicada para o bioprocessamento estudado, tendo diminuído a tensão superficial do meio para 29,52 mN/m e alcançado rendimento em biossurfactante de 3,0g/L. O presente estudo demonstrou a efetividade do planejamento experimental na produção de biossurfactante, comprovando, em consequência, elevado potencial para aplicações ambientais.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos bioquímicos anfifílicos produzidos principalmente por micro-organismos em condições aeróbias em meio aquoso a partir de matérias-primas fontes de carbono, tais como carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras, óleos ou suas misturas. Acredita-se que os biossurfactantes são secretados no meio de cultivo para auxiliar no crescimento do micro-organismo, facilitando o transporte e a translocação de substratos insolúveis através das membranas celulares (Campos *et al.*, 2013; Kapadia e Yagnik, 2013). Por conter grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, os biossurfactantes têm a capacidade de se acumular entre as fases dos fluidos, reduzindo assim a tensão superficial e interfacial nas regiões de superfície e de interface, respectivamente (Kapadia e Yagnik, 2013). Em termos de composição química, eles são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e biossurfactantes poliméricos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Os biossurfactantes oferecem diversas vantagens sobre os surfactantes químicos especialmente em relação à biodegradabilidade, não persistindo no ambiente e sendo degradados facilmente,

evitando problemas de acumulação; baixa toxicidade, o que permite seu uso seguro em cosméticos, produtos farmacêuticos e aditivos alimentares funcionais; seletividade elevada, devido à presença de grupos funcionais específicos, dando ao biossurfactante especificidade sobre substâncias poluentes específicas; e sua alta atividade, mesmo em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (Santos *et al.*, 2013; Kapadia e Yagnik, 2013).

Apesar das vantagens, os biossurfactantes ainda não são competitivos com os seus análogos sintéticos devido ao seu alto custo de produção. Por exemplo, em 2012, o mercado global de surfactantes químicos movimentou cerca de 12 milhões de toneladas do produto em comparação com 3,5 milhões de toneladas de biossurfactantes (Campos *et al.*, 2013). Nesse sentido, o desenvolvimento de processos mais econômicos para a produção de biossurfactantes tornou-se o ponto chave para redução dos custos e aumento da competitividade. Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substrato de baixo custo para este fim. A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia global de um bioprocessamento, uma vez que eles representam cerca de 50% do custo final do produto (Rufino *et al.*, 2014). Resíduos tais como gordura animal do processamento de carne bovina (Santos *et al.*, 2013), resíduo de refinaria de óleo de amendoim (Luna *et al.*, 2013), óleo de canola residual obtido de restaurante (Silva *et al.*, 2013), resíduo de refinaria de óleo de soja (Rufino *et al.*, 2014), glicerol (Silva *et al.*, 2010), dentre outros, já demonstraram excelentes resultados quando empregados para a produção de biossurfactantes por micro-organismos.

Mais recentemente, planejamentos experimentais e Metodologia de Superfície de resposta (MSR) têm sido eficientemente empregados para reduzir ainda mais os custos de produção nos processos biotecnológicos, por meio da seleção de proporções equilibradas dos constituintes do meio de produção. Estes métodos têm sido aplicados com sucesso na otimização de meios de cultivo para produção de biossurfactantes (Luna *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Sendo assim, este trabalho objetivou a produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* UCP 0996 utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo empregando planejamento experimental.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo *Candida tropicalis* UCP 0996 foi obtido da coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (Recife, Pernambuco). O micro-organismo foi mantido à 5°C em tubo inclinado contendo meio Yeast Mold Agar (YMA) com a seguinte composição (p/v): extrato de levedura (0.3%), extrato de malte (0.3%), triptona (0.5%), D-glicose (1.0%), e ágar (5.0%). Transferências foram realizadas para novos tubos com meio fresco a cada mês para manter a viabilidade.

2.2. Substratos

O óleo de canola residual foi obtido de um restaurante local da cidade do Recife (estado de

Pernambuco, Brasil). A milhocina foi gentilmente cedida pela empresa Corn Products Brasil, situada no município de Cabo de Santo Agostinho, estado de Pernambuco, Brasil. O melaço foi obtido a partir de uma Usina de açúcar local, da cidade de Vitória, estado de Pernambuco, Brasil. Estes resíduos serviram como principais fontes de carbono, nitrogênio e de outros nutrientes essenciais para o metabolismo da levedura.

2.3. Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado pela transferência de uma amostra de *C. tropicalis* UCP 0996, crescida previamente por 72h em tubo contendo meio YMA, para frascos de Erlenmeyer (500ml) contendo 100ml de meio 'Yeast Mold Broth' (YMB) – sem ágar. O inóculo foi incubado em Shaker orbital a 200rpm e 28°C por 24h, e foi padronizado à concentração de 10^6 células/ml.

2.4. Planejamento experimental

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) com 16 pontos fatoriais, 10 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 30 ensaios, foi utilizado para avaliar a influência dos resíduos industriais, bem como da agitação e concentração de inóculo, na produção de biosurfactante. As concentrações de melaço, milhocina, óleo de canola residual, inóculo e a agitação foram as variáveis independentes. A tensão superficial foi a variável resposta. Os níveis das variáveis independentes bem como o intervalo experimental estão especificados na Tabela 1. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer (500ml) contendo 100ml do meio de produção formulado de acordo com planejamento experimental. Os frascos foram incubados a 28°C durante 120 horas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se software Statistica[®] versão 6.0 (Statsoft Inc, USA).

Tabela 1 – Intervalo experimental e níveis das variáveis independentes estudadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Variável	Níveis codificados da variável				
	-2	-1	0	+1	+2
Melaço (%)	2	2,5	3	3,5	4
Milhocina (%)	2	2,5	3	3,5	4
Óleo de canola (%)	2	2,5	3	3,5	4
Agitação (rpm)	100	150	200	250	300
Tamanho do inóculo (%)	1	2	3	4	5

2.5. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada a partir do líquido metabólico livre de células, utilizando um tensiômetro automático KSV Sigma 700 (Finland) com o anel de NUOY. A tensão superficial foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido.

2.6. Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante foi extraído do meio de cultivo após remoção das células por centrifugação a 5000 x g por 15 min. Ao líquido metabólico livre de células foi adicionado igual volume de uma solução de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). A mistura foi agitada vigorosamente por 15 min e deixada repousar até separação das fases. A fase inferior contendo o biossurfactante foi transferida para um bquer e a fase superior foi submetida à operação por mais duas vezes para completa extração do biossurfactante. O rendimento em biossurfactante foi expresso em (g/L).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Delineamento Composto Central Rotacional permitiu estudar o comportamento da variável resposta Tensão superficial em função das variáveis concentração de melaço, concentração de óleo de canola residual e concentração de milhocina, bem como da agitação e da concentração de inóculo (Tabela 2). Os melhores resultados observados para a produção do biossurfactante, expressos em termos de Tensão superficial, foram obtidos nos ensaios 7, 3 e 2, respectivamente (Tabela 2). No entanto, analisando a efetividade do processo com relação aos custos de produção, as condições encontradas no ensaio 2 contendo 2,5% de melaço, 2,5% de milhocina, 2,5% de óleo de canola residual 2% de inóculo, com agitação orbital de 250rpm são as mais indicadas para o bioprocessamento em estudo, uma vez que os constituintes do meio de cultivo, tais como melaço, milhocina e óleo de canola residual, foram utilizados nas suas concentrações no nível inferior de suas variáveis codificadas (-1), alcançando, no entanto, resultados satisfatórios tais quais aos obtidos nos ensaios 7 e 3. O rendimento em biossurfactante encontrado no ensaio 2 foi de 3g/L. Resultado semelhante também foi encontrado por Batista *et al.* (2010), os quais investigaram a produção de biossurfactante também por *C.tropicalis* empregando planejamento experimental 2^{5-1} e utilizando óleo de fritura residual como substrato de baixo custo, obtendo rendimento máximo de 3,61g/L. Estas características associadas à somente 120h de processo constituem vantagens para um processo de produção em larga escala.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental da produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* UCP 0996 de acordo com o DCCR.

Ensaios	Melaço (%) X_1	Milhocina (%) X_2	Óleo de Canola (%) X_3	Agitação (rpm) X_4	Tamanho do inóculo (%) X_5	Tensão Superficial (mN/m) Y
1	-1(2,5)	-1(2,5)	-1(2,5)	-1(150)	+1(4)	35,01
2	-1(2,5)	-1(2,5)	-1(2,5)	+1(250)	-1(2)	29,52
3	-1(2,5)	-1(2,5)	+1(3,5)	-1(150)	-1(2)	29,47
4	-1(2,5)	-1(2,5)	+1(3,5)	+1(250)	+1(4)	32,52
5	-1(2,5)	+1(3,5)	-1(2,5)	-1(150)	-1(2)	29,70
6	-1(2,5)	+1(3,5)	-1(2,5)	+1(250)	+1(4)	31,67
7	-1(2,5)	+1(3,5)	+1(3,5)	-1(150)	+1(4)	29,19

8	-1(2,5)	+1(3,5)	+1(3,5)	+1(250)	-1(2)	29,97
9	+1(3,5)	-1(2,5)	-1(2,5)	-1(150)	-1(2)	31,09
10	+1(3,5)	-1(2,5)	-1(2,5)	+1(250)	+1(4)	33,75
11	+1(3,5)	-1(2,5)	+1(3,5)	-1(150)	+1(4)	36,29
12	+1(3,5)	-1(2,5)	+1(3,5)	+1(250)	-1(2)	31,37
13	+1(3,5)	+1(3,5)	-1(2,5)	-1(150)	+1(4)	36,26
14	+1(3,5)	+1(3,5)	-1(2,5)	+1(250)	-1(2)	32,45
15	+1(3,5)	+1(3,5)	+1(3,5)	-1(150)	-1(2)	30,45
16	+1(3,5)	+1(3,5)	+1(3,5)	+1(250)	+1(4)	31,84
17	-2(2)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	33,74
18	+2(4)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	35,44
19	0(3)	-2(2)	0(3)	0(200)	0(3)	34,41
20	0(3)	+2(4)	0(3)	0(200)	0(3)	32,83
21	0(3)	0(3)	-2(2)	0(200)	0(3)	33,91
22	0(3)	0(3)	+2(4)	0(200)	0(3)	32,65
23	0(3)	0(3)	0(3)	-2(100)	0(3)	32,54
24	0(3)	0(3)	0(3)	+2(300)	0(3)	32,93
25	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	-2(1)	32,14
26	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	+2(5)	35,11
27	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	34,83
28	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	34,88
29	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	36,02
30	0(3)	0(3)	0(3)	0(200)	0(3)	34,61

A aplicação da metodologia de superfície de resposta para a estimativa dos parâmetros ótimos resultou em uma relação empírica entre os valores da tensão superficial e as variáveis do processo. A Equação 1 representa o modelo empírico ajustado pela análise de variância (ANOVA). A ANOVA é essencial para testar a significância e adequação de um modelo. Os p-valores e F-valores (com intervalo de confiança de 95%) foram utilizados para verificar a significância das variáveis estudadas e suas respectivas interações.

$$Y = - 68,3327 + 7,8979X_1 + 18,5038X_2 + 21,4179X_3 - 0,1303X_4 + 11,8173X_5 - 1,5206X_1^2 - 2,4906X_2^2 - 2,8306X_3^2 - 0,0003X_4^2 - 0,6214X_5^2 + 1,1227X_1X_2 + 0,2873X_1X_3 - 0,0125X_1X_4 + 0,3814X_1X_5 - 2,2273X_2X_3 + 0,00634X_2X_4 - 1,2164X_2X_5 + 0,0124X_3X_4 - 0,6686X_3X_5 - 0,0120X_4X_5 \quad (1)$$

Onde Y é a variável resposta e X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5 representam os valores codificados das concentrações de melaço, milhocina, óleo de soja pós-fritura, da agitação e da quantidade de inóculo, respectivamente. Os coeficientes da Equação 1 foram calculados utilizando o programa

STATISTICA. Os parâmetros em negrito são todos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

De todas as variáveis estudadas, a agitação (X_4) foi a única que não apresentou significância estatística no bioprocessamento ($F = 1,34$; $p = 0,33$). Já o tamanho do inóculo (X_5) foi o fator mais importante para a diminuição da tensão superficial, seguido pela concentração do melaço (X_1) e pela interação entre a concentração de milhócia (X_2) e o tamanho do inóculo (X_5), todas com $F > 4$ e $p < 0,05$. A interação entre a agitação (X_4) e o tamanho do inóculo (X_5), a interação entre a concentração de milhócia (X_2) e a concentração do óleo de canola (X_3), a concentração do óleo de canola (X_3) e a concentração de milhócia (X_2) também tiveram significância estatística, em menor grau, sobre o processo ($F > 4$; $p < 0,05$). O efeito negativo das variáveis no modelo denota que seu aumento ocasionou uma diminuição da tensão superficial. Já o efeito positivo denota que sua diminuição também ocasionou uma diminuição da tensão superficial.

O erro puro relativamente baixo (Pure Error = 1,21) indicou uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais e a falta de ajuste (Lack of Fit = 12,29) foi praticamente insignificante. O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de correlação, R^2 , que foi de 0,8998, o qual sugere que 89,98% das variações observadas são atribuídas às variáveis estudadas, indicando um ajuste adequado do modelo quadrático aos dados experimentais. Quanto mais perto o valor de R^2 estiver de 1, melhor será o modelo para explicar a variabilidade entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo (Sayyad *et al.*, 2007).

A utilização de rejeitos industriais na produção de biossurfactantes possui duas principais vantagens: a redução dos custos de produção (Rufino *et al.*, 2014) e diminuição de prováveis impactos ambientais que poderiam ser gerados pela disposição indevida de resíduos (Kim e Vipulanandan, 2006). Para aumentar ainda mais esta vantagem, pesquisadores têm concentrado seus esforços em desenvolver processos mais econômicos baseados em estudos de planejamentos experimentais com a finalidade de aproveitar de forma mais eficiente as proporções dos resíduos, obtendo o máximo de produção possível de biossurfactante com uso de proporções equilibradas dos componentes do meio de cultivo (Batista *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013), auxiliando ainda mais na redução dos custos de produção. Uma vez produzido e isolado, os biossurfactantes podem ser aplicados no tratamento de locais impactados, por exemplo, por petróleo e seus derivados (Luna *et al.*, 2013) ou na remoção de metais pesados (Rufino *et al.*, 2011), agindo como agentes de remediação ambiental.

CONCLUSÕES

1. O emprego de um delineamento composto central rotacional (DCCR) e da metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficaz na seleção da melhor composição do meio na produção do biossurfactante por *Candida tropicalis*, provando ser uma técnica efetiva para reduzir os custos de processo;

2. O presente trabalho comprovou a viabilidade da utilização de resíduos industriais para a produção de biossurfactante, demonstrando, em consequência, elevado potencial para aplicações industriais e ambientais a um baixo custo;
3. Ficou demonstrado o benefício duplo da produção de biossurfactante sobre o ambiente, seja pela utilização de resíduos, potenciais poluidores ambientais, ou pela aplicação direta do biossurfactante para fins ambientais.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, R. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. *WER*, v. 82, p. 418-425, 2010.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. *Biotechnol. Prog.*, v. 29, p. 1097–1108, 2013.
- KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, v. 4, p. 1 – 8, 2013.
- KIM, J.; VIPULANANDAN, C. Removal of Lead from Contaminated Water and Clay Soil Using a Biosurfactant. *J. Environ. Eng.*, v. 132, p. 777–786, 2006.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Coll. Surf. B: Biointer.*, v. 102, p. 202-209, 2013.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L.R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Curr. Microbiol.*, v. 62, p. 1527–1534, 2011.
- PACWA–PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA–SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, p. 633–654, 2011.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic J. Biotech.*, v. 17, p. 34–38, 2014.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; Teixeira, J. A.

C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Coll. Surf. B: Biointer.*, v.84, p.1–5, 2011.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *J. Petrol. Sci. Eng.*, v. 105, p. 43–50, 2013.

SAYYAD, S.A.; PANDA, B.P.; JAVED, S.; ALI, M. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 73, p. 1054 – 1058, 2007.

SILVA, R. C. F. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; FARIAS, C. B. B.; FILHO, H. J. B.; SANTOS, V. A. SARUBBO, L. A. Enhancement of Biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. *Tenside Surf. Deterg.*, v. 50, p. 137-142, 2013.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Coll. Surf. B: Biointer.*, v. 79, p. 174–183, 2010.