

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

REGIANE STRAPAZZON

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE POR *Kluyveromyces marxianus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**FRANCISCO BELTRÃO
2015**

REGIANE STRAPAZZON

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE POR *Kluyveromyces marxianus***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental da UTFPR, Câmpus Francisco Beltrão.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Eugênia Castro Bravo

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elisete Guimarães

FRANCISCO BELTRÃO

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE POR *Kluyveromyces marxianus***

por

REGIANE STRAPAZZON

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 09 horas e 00 min., do dia 27 de novembro de 2015, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Bortoli

Coordenador do Curso de Engenharia
Ambiental

Prof. Dra. Claudia Eugênia Castro

Bravo

Professora Orientadora

Prof. Dra. Ellen Porto

Membro da Banca

Prof. Dra. Elisete Guimarães

Professora Coorientadora

Prof. M^a. Denise Szymczak

Professora do TCC2

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

Dedico este trabalho a Roni Strapazzon e a Luci Ana Biscoli Strapazzon (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me mostrar que a dedicação, a fé e a perseverança são caminhos para seguir sempre em frente.

Agradeço ao meu pai Roni Strapazzon, por ser meu alicerce, minha fortaleza, o meu apoio. Sua ajuda, sua dedicação e o seu amor incondicional foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha orientadora Claudia, pelos conselhos, pelas correções, pela ajuda no laboratório, pela paciência, amizade e aprendizado partilhado durante esta etapa.

À minha coorientadora Elizete Guimarães, pela literatura indicada, correções e tempo dedicado a este trabalho.

Às minhas irmãs, Liana e Luana Strapazzon pelas palavras de conforto, pelo carinho, pela paciência e pelo amor dedicado, agradeço.

Ao meu namorado Roni Tavares, pois o seu apoio e o seu amor foram de fundamental importância. Obrigada por me proporcionar dias mais felizes.

À Yara e ao meu irmão Felipe, agradeço pelo carinho e por compreenderem minha ausência.

À Helen e a Marina, pelo companheirismo, pela ajuda e tempo dedicado no laboratório.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, pelos momentos de descontração, risadas e companheirismo durante os anos de graduação.

“Você nunca sabe a força que tem, até que sua única alternativa é ser forte”.

(Johnny Depp)

RESUMO

STRAPAZZON, Regiane. **Determinação das condições ideais para produção de biossurfactante por *Kluyveromyces marxianus***. 2015. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2015.

Os surfactantes são compostos tensoativos que diminuem a tensão superficial e são produzidos por síntese química ou biológica. Os surfactantes biológicos ou biossurfactantes são produzidos pelo metabolismo de microrganismos e apresentam vantagens em relação ao uso dos químicos, principalmente pela baixa toxicidade e biodegradabilidade. A produção de biossurfactante está atrelada a todos os fatores que influenciam no crescimento microbiano, como a variação dos nutrientes fornecidos, principalmente quando se altera a fonte de carbono e nitrogênio, bem como das formas de condução do processo e do preparo do meio de cultura. Utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactante, variando as fontes de carbono e nitrogênio, além da determinação do índice de emulsão e da produção de biomassa. A produção de biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica, sendo o melhor resultado obtido pelo experimento de número 04 contendo o meio base e mais 2% de óleo de soja; 20% de óleo de milho; 2% de glicerol; 10% de glicose; 0,1% de sulfato de amônio e 2% de extrato de levedura. O índice emulsificante foi determinado pela altura da emulsão formada, sendo o resultado expresso em porcentagem. De acordo com o planejamento experimental fatorial proposto e com base nos resultados experimentais, as condições ideais de produção de biossurfactante foram evidenciadas no experimento 12, constituído pelo meio base e mais 2% de óleo de soja; 20% de óleo de milho; 2% de glicerol; 10% de glicose; 0,1% de sulfato de amônio e 0,2% de extrato de levedura, incubados em mesa agitadora a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 144 horas. Os resultados apresentados mostram que a levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) demonstrou potencial para produção de biossurfactante.

Palavras-chave: Surfactante biológico. Levedura. Tensão Superficial. Planejamento Fatorial.

ABSTRACT

STRAPAZZON, Regiane. **Determining the ideal conditions for biosurfactant production by *Kluyveromyces marxianus***. 2015. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2015.

Surfactants are surface-active compounds that reduce surface tension and are produced by chemical or biological synthesis. Biological surfactants or biosurfactants are produced by microorganisms metabolism and have advantages over the use of chemical, mainly by low toxicity and biodegradability. The biosurfactant production linked to all the factors that influence microbial growth, such as the variation of nutrients supplied, especially when changing the source of carbon and nitrogen, as well as ways of conduction the process and the preparation of the culture medium. The objective of this work was to produce biosurfactant using *Kluyveromyces marxianus*, varying sources of carbon and nitrogen, besides the determination of emulsifier index and biomass production. Biomass production was determined by gravimetry in analytical balance, being the best result obtained by experiment number 04 containing the base medium and 2% soy oil; 20% corn oil; 2% glycerol; 10% glucose; 0,1% ammonium sulfate and 2% yeast extract. The emulsifier index was determined by the height of the formed emulsion, being the result expressed in percentage. According to the proposed factorial experimental planning and based on the experimental results, the ideal conditions biosurfactant production were observed in experiment 12, constituted the base medium and 2% soy oil; 20% corn oil; 2% glycerol; 10% glucose; 0,1% ammonium sulfate and 0,2% yeast extract, incubated in shaking table at 200 rpm and temperature control at 28°C for 144 hours. The results show that the yeast *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) has demonstrated potential for biosurfactant production.

Keywords: Biological Surfactant. Yeast. Surface Tension. Factorial Planning.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 - AMOSTRA CENTRIFUGADA: FORMAÇÃO DO <i>PELLET</i> CELULAR...	25
FIGURA 2 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA.	26
FIGURA 3 - FORMAÇÃO DA EMULSÃO.....	27
FIGURA 4 - GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS EFEITOS DAS CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	30
FIGURA 5 - GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS EFEITOS DAS CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE (ÍNDICE EMULSIFICANTE).	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS DE VARIAÇÃO.....	23
TABELA 2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL $2^{(6-2)}$	23
TABELA 3 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>K. marxianus</i>	28
TABELA 4 - ESTIMATIVAS DOS EFEITOS DE CADA VARIÁVEL E SIGNIFICÂNCIA COM $P \leq 0,05$ PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA.	29
TABELA 5 - ÍNDICE DE EMULSÃO DE <i>K. marxianus</i>	32
TABELA 6 - ESTIMATIVAS DOS EFEITOS DE CADA VARIÁVEL E SIGNIFICÂNCIA COM $P \leq 0,05$ PARA O ÍNDICE DE EMULSÃO.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 BIOSSURFACTANTES.....	14
3.2 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES	19
3.3 EXPECTATIVAS SOBRE O USO DOS BIOSSURFACTANTES	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 MICRORGANISMO.....	22
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
4.3 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DA LEVEDURA	24
4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	25
4.4.1 Determinação da biomassa.....	25
4.4.2 Índice emulsificante	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA.....	28
5.2 ÍNDICE EMULSIFICANTE.....	31
6 CONCLUSÃO	36
7 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos com propriedades tensoativas, que podem ser produzidos por síntese química (surfactantes sintéticos/químicos) ou biológica (biossurfactantes). Sua estrutura molecular é composta de uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, as quais garantem algumas propriedades únicas e de grande interesse industrial como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (GOUVEIA et. al., 2003; WOODS, 2004).

A maioria dos surfactantes comercialmente disponíveis é sintetizada a partir de derivados de petróleo e são tóxicos para diferentes organismos, além de não serem prontamente biodegradáveis. Quando comparados com os surfactantes químicos, os biológicos, que são produzidos pelo metabolismo dos microrganismos, chamados de biossurfactantes, apresentam algumas vantagens, tais como: biodegradabilidade; pouca toxicidade; redução de tensão superficial; solubilidade; tolerância de pH e temperatura; produção a partir de resíduos alternativos e aceitabilidade ambiental (COLLA; COSTA, 2003). Na intenção de reduzir estas características indesejáveis, os biossurfactantes surgem como uma alternativa.

Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos como as bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos (BICCA; FLECK; AYUB, 1999). Estes microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes em diferentes substratos, como carboidratos e hidrocarbonetos, sendo esta, sua principal fonte de carbono, além da produção através de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais (COOPER, 1986; NITSCHKE; PASTORE, 2003).

Tanto a estrutura física quanto a estrutura química dos biossurfactantes podem ser obtidas ou alteradas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, dependendo do uso. Desta forma, o conhecimento da produção e das propriedades, melhora a eficácia do processo fermentativo e auxilia na escolha da matéria-prima, sendo esta responsável por 30% do custo de produção, além de ser essencial para as condições do crescimento microbiano (BUENO, 2014).

Dentre suas aplicações, os biossurfactantes são utilizados na indústria petrolífera para biorremediação de solos contaminados, limpeza de reservatórios de óleos e recuperação melhorada do petróleo (MEOR). São empregados também em

tratamentos terapêuticos; produtos de higiene; formulação de cosméticos; na agricultura, para formulação de herbicidas e pesticidas; na mineração, para separação e flotação de minérios; na indústria de alimentos devido à propriedade de emulsificação e nas indústrias de papel, têxtil e de cerâmica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O desenvolvimento de processos produtivos mais eficientes baseados no uso de substratos de fontes renováveis e de baixo custo, juntamente com a crescente preocupação ambiental aliada às novas legislações, faz com que haja uma necessidade de substituição dos surfactantes químicos pelos biológicos, principalmente pelas características atreladas aos surfactantes naturais, as quais são mais específicas e menos agressivas ao meio ambiente (BUENO, 2008).

Neste contexto, o uso de planejamentos experimentais e metodologias mais eficientes têm sido empregados para reduzir os custos dos processos biotecnológicos, para a obtenção de biossurfactante. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é otimizar as condições para a produção de biossurfactante pela levedura *Kluyveromyces marxianus*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Determinar as condições ideais para a produção de biossurfactante por *Kluyveromyces marxianus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o efeito e interações das concentrações de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante;
- ✓ Determinar as condições ideais para produção de biossurfactante por *Kluyveromyces marxianus*;
- ✓ Determinar a produção de biomassa;
- ✓ Determinar o índice emulsificante.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactante é a denominação de um grupo diverso formado por metabólitos de origem microbiana, cujas funções são similares as dos surfactantes sintéticos. São formados por moléculas hidrofílicas (polar) e hidrofóbicas (apolar), ou seja, são moléculas anfipáticas. A primeira parte pode ser anfotérica, não-iônica e iônica (catiônica ou aniônica), enquanto que a segunda parte geralmente é composta por uma cadeia hidrocarbonatada (RUFINO, 2010).

Os surfactantes biológicos apresentam algumas vantagens quando comparados aos surfactantes químicos como biodegradabilidade, baixa toxicidade, aumento da taxa de redução de tensão superficial, estabilidade térmica, variações de pH e reprodução a partir de substratos renováveis. O grande interesse em estudar os biossurfactantes está atrelado às aplicações ambientais como biorremediação de áreas contaminadas principalmente por hidrocarbonetos e o reaproveitamento de resíduos industriais (COLLA; COSTA, 2003).

Por serem moléculas anfipáticas, propiciam a redução da tensão superficial e interfacial no meio aquoso (SALGADO, 2013). A tensão superficial é a força de atração entre as moléculas dos fluídos, que diminui quando ocorre o aumento na concentração do surfactante, formando agregados de moléculas chamadas de micelas. Este agregado de micelas forma a concentração micelar crítica (CMC), que é representada pela quantidade mínima necessária de biossurfactante para que ocorra a diminuição da tensão superficial. A CMC pode ser definida também como a solubilidade do surfactante dentro da fase aquosa, e, dessa forma, avalia a atividade e a eficiência do surfactante (RUFINO, 2006).

Os biossurfactantes podem ser classificados pela espécie microbiana e pela sua estrutura. Em relação a sua estrutura, são divididos em cinco grupos: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos. Quanto à espécie microbiana, vários microrganismos são produtores de biossurfactantes, sendo que a eficiência na produção é determinada pela genética dos

microrganismos, bem como o tipo de substrato, nutrientes disponíveis, fonte de carbono, condições ambientais, dentre outros fatores (SOUZA-SOBRINHO, 2007).

Outra classificação para os biossurfactantes é estabelecida de acordo com sua massa molar. Isto é, os que apresentam baixa massa molar, que são os glicolípídeos e os lipopeptídeos, são mais eficientes na redução da tensão superficial e interfacial. De outro modo, os de alta massa molar, que são as proteínas, lipopolissacarídeos, polissacarídeos, lipoproteínas ou o conjunto desses biopolímeros, são poucos eficientes na redução da tensão superficial (RON; RONSERBERG, 2002)

Dentre os biossurfactantes microbianos, as bactérias mais estudadas são do gênero *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp., porém não são indicadas para o uso na indústria devido à possível patogenicidade. Já as leveduras, apresentam alguns ganhos, principalmente pelo seu *status* GRAS (*generally regarded as safe*), *status* este que indica que na levedura não há risco de toxicidade e patogenicidade. Além disso, quando cultivadas em substrato imiscíveis em água como os óleos, produzem emulsificantes extracelulares em altas concentrações. As mais estudadas são da espécie *Candida* e *Yarrowia*, bem como a *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Nitschke e Pastore (2002) definem as funções fisiológicas do biossurfactantes em: emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou de compostos insolúveis em água, contribuindo para o desenvolvimento dos microrganismos; aderência ou liberação onde o microrganismo pode se aderir ou se desligar de um determinado local para regular as propriedades da superfície celular e atividade antibiótica demonstrada por alguns microrganismos que têm a capacidade de funcionar como antibióticos, ou seja, melhoram as chances de sobrevivência e há uma maior competitividade na busca por nutrientes.

Além das funções fisiológicas as propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes são essenciais para a seleção do microrganismo capaz de produzir esta substância (SANTOS, 2013). Mesmo apresentando algumas diferenças entre as propriedades, algumas são comuns à maioria e apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos (NITSCHKE; COSTA, 2007).

De acordo com Bognolo (1999) e Nitschke e Costa (2007) estas propriedades são: atividade superficial e interfacial - os biossurfactantes são mais eficientes quando comparados aos surfactantes convencionais, pois, reduzem a tensão superficial em concentrações baixas de biossurfactantes; tolerância à temperatura, pH e força iônica, pois podem ser utilizados em ambientes sob condições extremas; biodegradabilidade, já que são facilmente degradados, sendo seu uso adequado para tratamento de resíduos e na biorremediação; baixa toxicidade, pois podem ser usados na indústria alimentícia e farmacêutica; disponibilidade, ou seja, podem ser produzidos a partir de substratos alternativos, como resíduos industriais; especificidade, esta propriedade tem maior relevância quando se trata da detoxificação de poluentes específicos para determinadas atividades, principalmente envolvendo a indústria de alimentos e biocompatibilidade e digestibilidade, garantindo a aplicação em indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

A produção de biossurfactante além de estar atrelada as funções fisiológicas e as propriedades físicas e químicas, deve-se investigar os fatores que influenciam no crescimento microbiano, juntamente com as condições ambientais e nutricionais fornecidas (ANTUNES, 2010). Fatores como a variação de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro, manganês e magnésio, bem como pH, temperatura, agitação, disponibilidade de oxigênio e as formas de condução do processo, são de grande valia para estudar a eficiência da produção. De acordo com o preparo do meio de cultura, os microrganismos podem vir a produzir biossurfactantes, com alterações em suas propriedades, principalmente quando há alterações na fonte de carbono (BANAT, 1995; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Sua produção pode acontecer de forma induzida ou através de compostos lipofílicos (gorduras, óleos vegetais e lipídeos), variando as condições operacionais como o pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação. Pode ocorrer também quando o crescimento celular é mantido sob baixas concentrações de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997).

De acordo com Sylatk e Wadner (1987) apud Fontes (2008), há diferentes métodos para a produção de biossurfactantes, como:

- Crescimento celular: quando há indução da produção por substratos lipofílicos, otimização da composição do meio e das

condições operacionais e adição de reagente para provocar alteração na permeabilidade da parede celular;

- Crescimento celular em condições limitantes: quantidade de nutrientes e condições do meio.
- Produção por *resting cell*: células livres; células imobilizadas e células imobilizadas com remoção simultânea do produto e produção por *resting cell* associado à adição de precursores, ou seja, quando há implementação de um composto lipofílico no meio de cultura para alterar a produção qualitativamente e quantitativamente (DESAI; BANAT, 1997).

Com o intuito de reduzir os gastos principalmente com matéria prima, alguns autores defendem a utilização de substratos alternativos para a produção de biossurfactante. Rossmann (2008) utilizou a manipueira e o melaço para a produção de biossurfactante. Segundo o autor, este meio apresentou-se como uma alternativa viável, sendo um substrato de baixo custo e a composição do meio suporta o crescimento microbiano em espécies como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* ssp.

Salgado (2013) apresentou resultados favoráveis utilizando a combinação dos substratos manipueira, óleo pós-fritura e óleos vegetais *in-natura* de coco e de dendê. Além de reduzir os gastos com a produção, há o reaproveitamento de resíduos, sendo uma alternativa vantajosa e que ainda diminui o impacto ambiental.

Vaz (2013) utilizou a bactéria *Bacillus pumilus* para produzir biossurfactante, empregando farelo de trigo como substrato, além de utilizar indutores como o biodiesel e óleo diesel. A autora ainda variou fontes de nitrogênio (ureia, NaNO_3 e NH_4NO_3), sendo que a ureia apresentou os melhores resultados. Dessa forma, constatou que o substrato alternativo testado por ela (farelo de milho), é uma alternativa capaz de reduzir os custos com a produção.

Outro estudo, demonstrado por Antunes e colaboradores (2013), utilizaram resíduos como a milhocina e óleo de milho pós-fritura para a produção de biossurfactantes através da *Chromobacterium violaceum*. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram elevado potencial de produção, mesmo utilizando nutrientes de baixo valor agregado.

Rufino e colaboradores (2006) estudaram a produção de biossurfactante pela levedura *Candida lipolytica* cultivada em meio mineral contendo resíduo industrial de refinaria de óleo vegetal como substrato de baixo custo, juntamente

com o extrato de levedura. Os autores concluíram que o biossurfactante produzido por esta levedura apresentou estabilidade mesmo variando o tempo de cultivo, a temperatura e diferentes concentrações de sal. Dessa forma, concluíram que este biossurfactante pode ser utilizado na remediação de áreas contaminadas por compostos oleosos.

Fontes (2008) também utilizou uma levedura a *Yarrowia lipolytica* para a produção de biossurfactante. Utilizou um planejamento fatorial completo 2^4 , para avaliar os efeitos das variáveis estudadas. A autora otimizou os processos modificando a condição de aeração, velocidade de agitação, fonte de carbono e nitrogênio, além de utilizar substratos alternativos. Dessa forma obteve um biossurfactante com características satisfatórias além de um produto biotecnológico com capacidade de aplicação futura.

Luna, Sarrubo e Campos-Takaki (2006) estudaram a produção de biossurfactante pela levedura *Candida glabrata*. Com o auxílio de um planejamento fatorial, variaram os componentes do meio de cultura em: óleo de algodão, glicose e extrato de levedura. Os melhores resultados foram obtidos nos valores de 7,5% de óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura. Desse modo, concluíram que o biossurfactante produzido por esta espécie de levedura, mostrou-se capaz de reduzir a tensão superficial, apresentar estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e diferentes concentrações salinas, além de ter um elevado potencial para aplicação ambiental para a remoção de óleo em ambientes contaminados.

A produção de biossurfactante também foi investigada por Amézcuca-Vega e colaboradores (2007) utilizando a espécie de *Candida ingens*, com o auxílio de um planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ para investigar o efeito das relações carbono/nitrogênio, carbono/ferro, carbono/magnésio e carbono/fósforo. Os autores observaram que a produção de biossurfactante e a redução da tensão superficial variaram de acordo com a relação das variáveis estudadas.

Com o uso de ácidos graxos residuais Felse e colaboradores (2007) estudaram a produção de biossurfactante pela espécie *Candida bombicola*. Variando os substratos entre hidrocarbonetos e carboidratos e utilizando um sistema de batelada, obtiveram uma boa concentração do biossurfactante do tipo sofrorolípídeos.

Almeida e colaboradores (2014) investigaram a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais: o óleo de canola residual, a

milhocina e o melaço que serviram como principais fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes essenciais para o metabolismo da levedura. Com o auxílio de um planejamento experimental foi possível observar as interações mais efetivas, bem como comprovar o elevado potencial dos resíduos industriais para a produção de biossurfactante.

3.2 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

Uma das principais aplicações dos biossurfactantes se dá na indústria petrolífera para a biorremediação, dispersão de derramamento de óleo, remoção de resíduos de óleo em tanques e na recuperação terciária do petróleo (BOGNOLO, 1999). Além destas aplicações, podem ser utilizados na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica, agricultura, mineração, bem como nas indústrias de papel, têxtil e de cerâmica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Dentre as várias maneiras de degradação dos poluentes derivados de hidrocarbonetos, a biorremediação se destaca por ser uma tecnologia limpa e de baixo custo, pois utiliza a capacidade fisiológica dos microrganismos para degradar o poluente, utilizando o próprio poluente como fonte de carbono e energia (MACIEL; CAMPOS-TAKAKI; GUSMÃO, 2010).

A limpeza dos tanques e reservatórios de óleos é realizada através de solventes ou limpeza manual. Estes procedimentos além de serem caros, são demorados. Dessa forma, o biossurfactante surge como uma alternativa para diminuir a viscosidade promovida pela sedimentação do óleo no fundo dos tanques, facilitando o bombeamento do resíduo e a recuperação do óleo cru (BOGNOLO, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A recuperação terciária do petróleo consiste em utilizar os microrganismos produtores de biossurfactantes para a recuperação do óleo residual, pois diminuem a tensão superficial óleo-rocha. Várias técnicas são empregadas como: a injeção do microrganismo produtor de biossurfactante no reservatório e posterior propagação *in situ*; injeção de nutrientes no reservatório para estimular o crescimento desses microrganismos ou a produção de biossurfactante em reatores para depois injetá-los no reservatório (BANAT, 1995; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O uso de biossurfactantes na indústria alimentícia está relacionado com a propriedade de emulsificação devido à formação de consistência, textura e dispersão de fases em alimentos para o processamento da matéria-prima (GUDIÑO, 2001; LUNA, 2010).

São utilizados também na indústria de cosméticos e na produção de medicamentos, para a formulação de repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas e pasta de dente (MAIER; SOBERON-CHAVEZ, 2000; LUNA, 2010).

Culturas de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* estudadas por Polman e colaboradores (1994) apresentadas por Nitschke e Pastore (2002) foram utilizadas para a flotação e separação de calcita e eschelita, demonstrando resultados positivos quando comparados aos surfactantes químicos convencionais, já que estes são incapazes de separar estes dois minérios. Já na agricultura, estes microrganismos produtores de biossurfactante são utilizados para a formulação de pesticidas e herbicidas.

Em virtude das várias propriedades e das diversas possibilidades de aplicações dos biossurfactantes, torna-se essencial o aprimoramento das técnicas existentes e o desenvolvimento de novas estratégias e estudos para aumentar sua utilização, visto que possuem diversas aplicações tanto em nível ambiental, quanto em nível industrial (SOUZA-SOBRINHO, 2007).

3.3 EXPECTATIVAS SOBRE O USO DOS BIOSSURFACTANTES

O estudo crescente dos biossurfactantes está atrelado as suas propriedades comercialmente atrativas, além das vantagens que estes apresentam quando comparado ao seu similar sintético. Quando se fala em produção de metabólitos microbianos, ou seja, os biossurfactantes, três fatores devem ser levados em consideração: o custo da matéria-prima inicial; o procedimento adequado em termos de custo, produção, recuperação e o rendimento dos microrganismos (SOUZA-SOBRINHO, 2007).

De acordo com a literatura consultada, há uma semelhança em alguns procedimentos para otimizar a produção de biossurfactantes, como o uso de

substratos alternativos, para diminuir os custos de produção, caracterizando um fator positivo ao uso destes surfactantes biológicos, além de estarem contribuindo para a diminuição de um passivo ambiental.

Os biossurfactantes estão sendo cada vez mais estudados, com o intuito de aprimorar e aumentar a eficiência do processo, visto que sua aplicabilidade está relacionada principalmente a questões ambientais. Makkar e Cameotra (2002) apontaram alguns fatores que poderiam ser melhorados durante a produção como: uso de microrganismos modificados; substratos alternativos; produção manipulada, diminuindo os custos operacionais e a recuperação do biossurfactante realizada por técnicas mais simples como a centrifugação.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo determinar as condições ideais para produção de biossurfactante pela levedura *Kluyveromyces marxianus* baseado no efeito e interações das concentrações de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, na produção de biomassa e no índice emulsificante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

A levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) utilizada nesta pesquisa foi cedida gentilmente pelo professor Dr. Raúl Jorge Hernán Castro Gómez da Universidade Estadual de Londrina (UEL) a qual foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura para levedura (MPL - Extrato de malte – 0,3 g%; Extrato de levedura – 0,3 g%; Peptona bacteriológica – 0,5 g%; Glicose – 1 g%; Ágar – 2,0 g%), sob refrigeração a 4°C, passando por repiques periódicos para manter os microrganismos ativos.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental fatorial $2^{(6-2)}$ foi obtido com auxílio do programa computacional *Statistica 8.0*. As variáveis independentes estudadas no delineamento experimental fatorial $2^{(6-2)}$ constituíram em: óleo de soja (X_1), óleo de milho (X_2), glicerol (X_3), glicose (X_4), sulfato de amônio (X_5) e extrato de levedura (X_6). As variáveis dependentes foram a produção de biomassa e atividade emulsificante.

A Tabela 1 mostra a matriz do delineamento experimental $2^{(6-2)}$ e os níveis das variáveis estudadas.

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação.

Variáveis	Unidade	Código	Níveis (-)	Níveis (+)
Óleo de soja	mL 100 mL ⁻¹	X ₁	0,2	2,0
Óleo de milho	mL 100 mL ⁻¹	X ₂	2,0	20,0
Glicerol	mL 100 mL ⁻¹	X ₃	2,0	20,0
Glicose	g 100 mL ⁻¹	X ₄	1,0	10,0
Sulfato de amônio	g 100 mL ⁻¹	X ₅	0,1	1,0
Ext. de levedura	g 100 mL ⁻¹	X ₆	0,2	2,0

Fonte: Própria

A Tabela 2 mostra os dezesseis experimentos de acordo com o programa computacional *Statistica* 8.0 (BOX; DRAPPER, 1987).

Tabela 2 - Delineamento experimental fatorial 2⁽⁶⁻²⁾.

(continua)

Experimentos	Valor Codificado						Valor Descodificado (g ou mL 100 mL ⁻¹)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,2	2,0	2,0	1,0	0,1	0,2
2	1	-1	-1	-1	1	-1	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,2
3	-1	1	-1	-1	1	1	0,2	20,0	2,0	1,0	1,0	2,0
4	1	1	-1	-1	-1	1	2,0	20,0	2,0	1,0	0,1	2,0
5	-1	-1	1	-1	1	1	0,2	2,0	20,0	1,0	1,0	2,0
6	1	-1	1	-1	-1	1	2,0	2,0	20,0	1,0	0,1	2,0
7	-1	1	1	-1	-1	-1	0,2	20,0	20,0	1,0	0,1	0,2
8	1	1	1	-1	1	-1	2,0	20,0	20,0	1,0	1,0	0,2
9	-1	-1	-1	1	-1	1	0,2	2,0	2,0	10,0	0,1	2,0

Tabela 2 - Delineamento experimental fatorial 2⁽⁶⁻²⁾.

Experimentos	Valores codificados						Valores Descodificados (g ou mL 100 mL ⁻¹)						(conclusão)
10	1	-1	-1	1	1	1	2,0	2,0	2,0	10,0	1,0	2,0	
11	-1	1	-1	1	1	-1	0,2	20,0	2,0	10,0	1,0	0,2	
12	1	1	-1	1	-1	-1	2,0	20,0	2,0	10,0	0,1	0,2	
13	-1	-1	1	1	1	-1	0,2	2,0	20,0	10,0	1,0	0,2	
14	1	-1	1	1	-1	-1	2,0	2,0	20,0	10,0	0,1	0,2	
15	-1	1	1	1	-1	1	0,2	20,0	20,0	10,0	0,1	2,0	
16	1	1	1	1	1	1	2,0	20,0	20,0	10,0	1,0	2,0	

Fonte: Própria

4.3 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DA LEVEDURA

O preparo do inóculo ocorreu por meio do crescimento da levedura em meio de cultura MPL (Extrato de malte – 0,3 g%; Extrato de levedura – 0,3 g%; Peptona bacteriológica – 0,5 g%; Glicose – 1 g%; Agar – 2,0 g%), incubada em BOD por 48 horas a 37°C. Após esse período, com auxílio de alça de platina o inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 150 mL de caldo MPL previamente esterilizado.

De acordo com a metodologia proposta por Rufino (2006), a incubação foi realizada em mesa agitadora (shaker) a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 24 horas. Após esse período alíquotas de 1% (v/v) do inóculo foram transferidos para os dezesseis experimentos contendo o meio base (nitrato de amônio 0,1%, fosfato monopotássico 0,02%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,02%) e as variáveis independentes: óleo de soja (X₁), óleo de milho (X₂), glicerol (X₃), glicose (X₄), sulfato de amônio (X₅) e extrato de levedura (X₆).

Cada variável independente foi adicionada ao meio de acordo com as concentrações contidas na tabela 2, estabelecidas pelo planejamento fatorial obtido pelo programa computacional *Statística 8.0*.

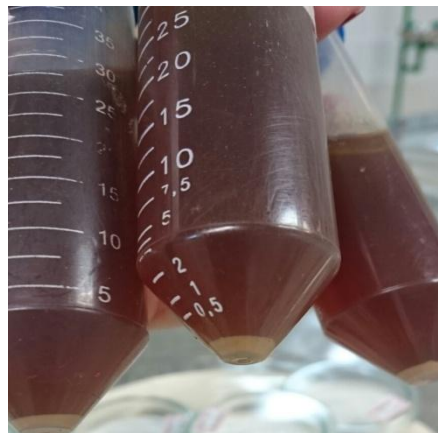
Após esse procedimento os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora (shaker) a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 144 horas seguindo a metodologia de Rufino (2006).

4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

4.4.1 Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada através da centrifugação do fermentado a 5000 rpm durante 20 minutos. Para obtenção da massa celular (*pellet*) o centrifugado foi lavado com água destilada gelada e colocado em placas de Petri com papel filtro previamente seco em estufa a 105°C por 24 horas. Para retirar o excesso da umidade, as placas de Petri contendo o *pellet* foram levadas à estufa a 105°C durante 24 horas. A biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica, pela diferença de peso inicial e peso final da placa de Petri (RUFINO, 2006).

A figura 1 evidencia a formação do *pellet* celular após a centrifugação das amostras.



**Figura 1 - Amostra centrifugada: formação do *pellet* celular.
Fonte: Própria.**

Após a centrifugação o *pellet* celular foi transferido para as placas de Petri para determinar a produção de biomassa (Figura - 2).

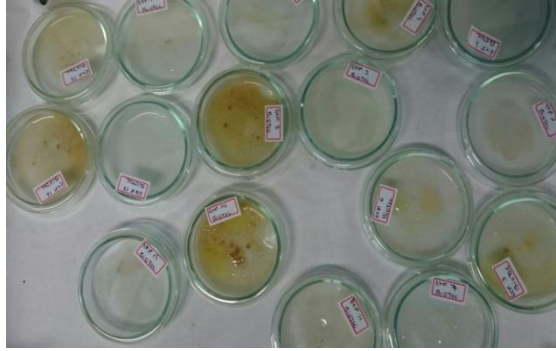


Figura 2 - Produção de biomassa.
Fonte: Própria.

4.4.2 Índice emulsificante

O índice emulsificante foi determinado seguindo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987). Transferiu-se 2 mL do meio fermentado centrifugado para tubos de ensaio e acrescentou-se de 2 mL de hexano. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas de repouso, a porcentagem do índice emulsificante foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Índice emulsificante (\%)} = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

H_e = altura de emulsão (cm).

H_t = altura total da solução (cm).

Após agitação em vórtex durante 2 minutos e repouso durante 24h, houve a formação da emulsão como mostra a Figura - 3.

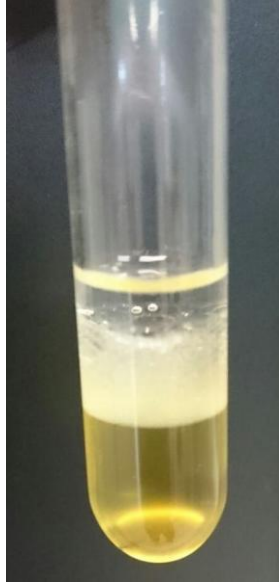


Figura 3 - Formação da emulsão.
Fonte: Própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

Os resultados da produção de biomassa de *Kluyveromyces marxianus* nas diferentes condições experimentais do planejamento fatorial $2^{(6-2)}$, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Produção de biomassa de *K. marxianus*.

Experimentos	Variáveis Independentes						Variável Dependente
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Biomassa (g ⁻¹ L)
1	0,2	2,0	2,0	1,0	0,1	0,2	1,0
2	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,2	0,2
3	0,2	20,0	2,0	1,0	1,0	2,0	6,2
4	2,0	20,0	2,0	1,0	0,1	2,0	6,4
5	0,2	2,0	20,0	1,0	1,0	2,0	0,6
6	2,0	2,0	20,0	1,0	0,1	2,0	1,2
7	0,2	20,0	20,0	1,0	0,1	0,2	1,4
8	2,0	20,0	20,0	1,0	1,0	0,2	3,2
9	0,2	2,0	2,0	10,0	0,1	2,0	3,4
10	2,0	2,0	2,0	10,0	1,0	2,0	4,9
11	0,2	20,0	2,0	10,0	1,0	0,2	4,5
12	2,0	20,0	2,0	10,0	0,1	0,2	4,2
13	0,2	2,0	20,0	10,0	1,0	0,2	0,4
14	2,0	2,0	20,0	10,0	0,1	2,0	0,7
15	0,2	20,0	20,0	10,0	0,1	2,0	1,8
16	2,0	20,0	20,0	10,0	1,0	2,0	5,0

Fonte: Própria.

Há uma forte tendência no aproveitamento da biomassa de leveduras em função das propriedades específicas que alguns dos principais constituintes da parede celular das leveduras podem apresentar, tais como as manoproteínas, que

apresentam propriedades bioemulsificantes (CAMERON et al., 1988; BARRIGA et al. 1999; DIKIT et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo, levando em consideração as condições experimentais, mostraram que a produção de biomassa nos experimentos variou de 0,2 a 6,4 g de biomassa L⁻¹ de meio fermentado. A condição que pareceu menos favorável para a produção de biomassa de *K. marxianus*, foi no experimento 2, que produziu apenas 0,2 g L⁻¹, constituído de 2% de óleo de soja, 2% de óleo de milho, 2% de glicerol, 1% de glicose, 1% de sulfato de amônio e 0,2% de extrato de levedura. Verificou-se através da análise estatística que a estimativa da contribuição do glicerol (X₃) foi significativamente negativa (p≤0,05), ou seja, indica que um aumento da concentração (%) desta variável independente na formulação do meio de cultura, provocaria uma diminuição na produção de biomassa, e uma diminuição da concentração deste parâmetro dentro da faixa estudada, incrementaria a produção de biomassa, portanto é melhor trabalhar com a menor concentração (%) de glicerol.

De forma diferente, a estimativa da contribuição das variáveis, óleo de milho e extrato de levedura foram significativamente positivas (p≤0,05) e um aumento da concentração destes parâmetros dentro da faixa estudada, incrementaria a produção de biomassa. As variáveis, óleo de soja, glicose, sulfato de amônio apresentam efeito positivo na produção de biomassa, porém não são significativas (Tabela 04).

Tabela 4 - Estimativas dos efeitos de cada variável e significância com p≤0,05 para a produção de biomassa.

Variáveis	Efeitos	p
Óleo de soja	0,76250	0,1689
Óleo de milho	2,53750	0,0007
Glicerol	-2,06250	0,0029
Glicose	0,58750	0,2788
Sulfato de amônio	0,66250	0,2260
Extrato de Levedura	1,73750	0,0077

Fonte: Própria.

Verificou-se por meio da ANOVA que, as variáveis independentes, óleo de milho (X_2), glicerol (X_3), e extrato de levedura (X_6) foram significativas ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$), indicando que a quantidade (%) dessas variáveis utilizadas na formulação do meio de cultura tem influência na produção de biomassa. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,8657 o que indica uma excelente relação (86,57 %) dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 13,43% da variação na produção de biomassa não pode ser explicado pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma maior produção de biomassa.

Analisando os gráficos da Figura 4, pode-se reafirmar que, dentro do intervalo estudado, a melhor condição para a produção de biomassa de *K. marxianus* é a do experimento 4, constituído de 2% de óleo de soja, 20% de óleo de milho, 2% de glicerol, 1% de glicose, 0,1% de sulfato de amônio e 2% de extrato de levedura, com uma produção de biomassa de $6,4 \text{ g L}^{-1}$.

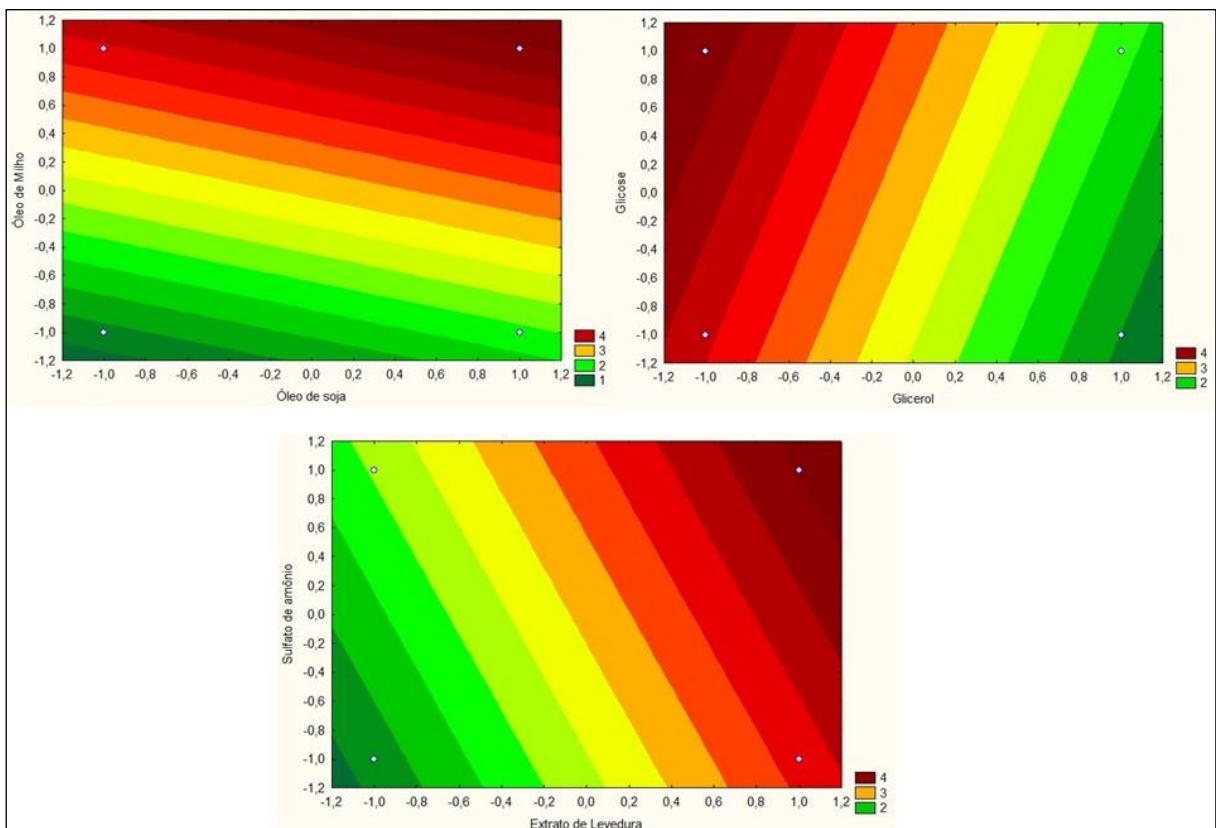


Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes na produção de biomassa.

Fonte: Programa computacional *Statistica* 8.0.

De acordo com a literatura consultada, observa-se que a produção de biomassa e outros produtos biotecnológicos de interesse podem ser influenciados pelas condições de cultivos, em particular do meio de cultura, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, bem como pH e temperatura de cultivo (BRAVO et. Al., 2000; BRAVO-MARTINS et. al., 2009; BRAVO; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

5.2 ÍNDICE EMULSIFICANTE

Os bioemulsificantes produzidos pelos microrganismos são compostos por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas anfipáticas sendo capazes de estabilizar emulsões (TOREN et. al., 2003). A capacidade de formar emulsões está relacionada com a manoproteína, ou seja, a parte hidrofílica da manose, que se une com a parte proteica, esta hidrofóbica e formam uma estrutura anfipática, responsável pela emulsão (LUKONDEH; ASHBOLT; ROGERS, 2003). É devido a estas porções hidrofílicas e hidrofóbicas das manoproteínas que estas são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de compostos imiscíveis (BERTON; GENOT; MARIE-HÉLÈNE, 2011), podendo auxiliar nos processos de fixação de resíduos oleosos pelos microrganismos ativos presentes no ambiente.

A produção de biosurfactante pôde ser evidenciada pelos resultados obtidos do índice emulsificante do meio fermentado por *K. marxianus* (Tabela 5).

Tabela 5 - Índice de emulsão de *K. marxianus*.

Experimentos	Variáveis Independentes						Variável Dependente
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Índice de Emulsão (%)
1	0,2	2,0	2,0	1,0	0,1	0,2	8,33
2	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,2	3,33
3	0,2	20,0	2,0	1,0	1,0	2,0	33,33
4	2,0	20,0	2,0	1,0	0,1	2,0	56,66
5	0,2	2,0	20,0	1,0	1,0	2,0	16,66
6	2,0	2,0	20,0	1,0	0,1	2,0	40,0
7	0,2	20,0	20,0	1,0	0,1	0,2	10,0
8	2,0	20,0	20,0	1,0	1,0	0,2	10,0
9	0,2	2,0	2,0	10,0	0,1	2,0	33,33
10	2,0	2,0	2,0	10,0	1,0	2,0	13,05
11	0,2	20,0	2,0	10,0	1,0	0,2	40,0
12	2,0	20,0	2,0	10,0	0,1	0,2	60,0
13	0,2	2,0	20,0	10,0	1,0	0,2	4,00
14	2,0	2,0	20,0	10,0	0,1	2,0	50,0
15	0,2	20,0	20,0	10,0	0,1	2,0	50,0
16	2,0	20,0	20,0	10,0	1,0	2,0	8,33

Fonte: Própria

De acordo com os resultados, o índice emulsificante variou entre 3 a 60%, sendo que a condição com o menor índice emulsificante foi encontrado no experimento 2 (3,33%), constituído por 2% de óleo de soja; 2% de óleo de milho; 2% de glicerol; 1% de glicose; 1% de sulfato de amônio e 0,2% de extrato de levedura. Por outro lado, a condição com o maior índice emulsificante foi encontrado no experimento 12, com índice emulsificante de 60%, sendo constituído por 2% de óleo de soja; 20% de óleo de milho; 2% de glicerol; 10% de glicose; 0,1% de sulfato de amônio e 0,2% de extrato de levedura.

De acordo com a análise estatística, as variáveis independentes que produziram efeito negativo foram o glicerol (X₃) e o sulfato de amônio (X₅), este último, estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Em contrapartida, as variáveis óleo de milho (X₂) e glicose (X₄), mostraram um efeito significativamente positivo ($p \leq 0,05$). Dessa forma, formulações de meio de cultura com concentrações maiores de óleo de milho e glicose, poderiam aumentar o

índice emulsificante. As variáveis óleo de soja (X_1) e extrato de levedura (X_5) apresentaram um efeito positivo, contudo não foi significativo ao nível de 95% de confiança.

A Tabela 6 mostra os resultados dos efeitos de cada variável no índice emulsificante e sua significância de acordo com cada variável independente estudada.

Tabela 6 - Estimativas dos efeitos de cada variável e significância com $p \leq 0,05$ para o índice de emulsão.

Variáveis	Efeitos	p
Óleo de soja	10,5487	0,142718
Óleo de milho	17,2863	0,027274
Glicerol	-1,7963	0,790653
Glicose	15,6338	0,041208
Sulfato de amônio	-16,8688	0,030271
Extrato de Levedura	13,0462	0,078257

Fonte: Própria.

Analisando os gráficos da Figura 5, pode-se reafirmar que, dentro do intervalo estudado, a melhor condição para obter um índice emulsificante é a do experimento 12, com as concentrações das variáveis que tiveram um efeito positivo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), óleo de milho e glicose em seus níveis máximos, 20% e 10% respectivamente e a concentração de sulfato de amônio, com efeito, negativo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) em concentração mínima de 0,1%.

À medida que as concentrações de óleo de milho (X_2) e glicose (X_4) aumentam, o índice emulsificante também aumenta. Entretanto, se as concentrações de sulfato de amônio aumentam, ocorre uma diminuição do índice emulsificante. É importante ressaltar que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,7413 o que indica uma boa relação (74,13%) dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 25,87% da variação

do índice emulsificante não pode ser explicado pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir um índice emulsificante maior.

De acordo com Souza-Sobrinho (2007) vários microrganismos produzem biossurfactantes, sendo que a eficiência na produção é determinada pela genética dos microrganismos, bem como o tipo de substrato, nutrientes disponíveis, fonte de carbono, condições ambientais, dentre outros fatores.

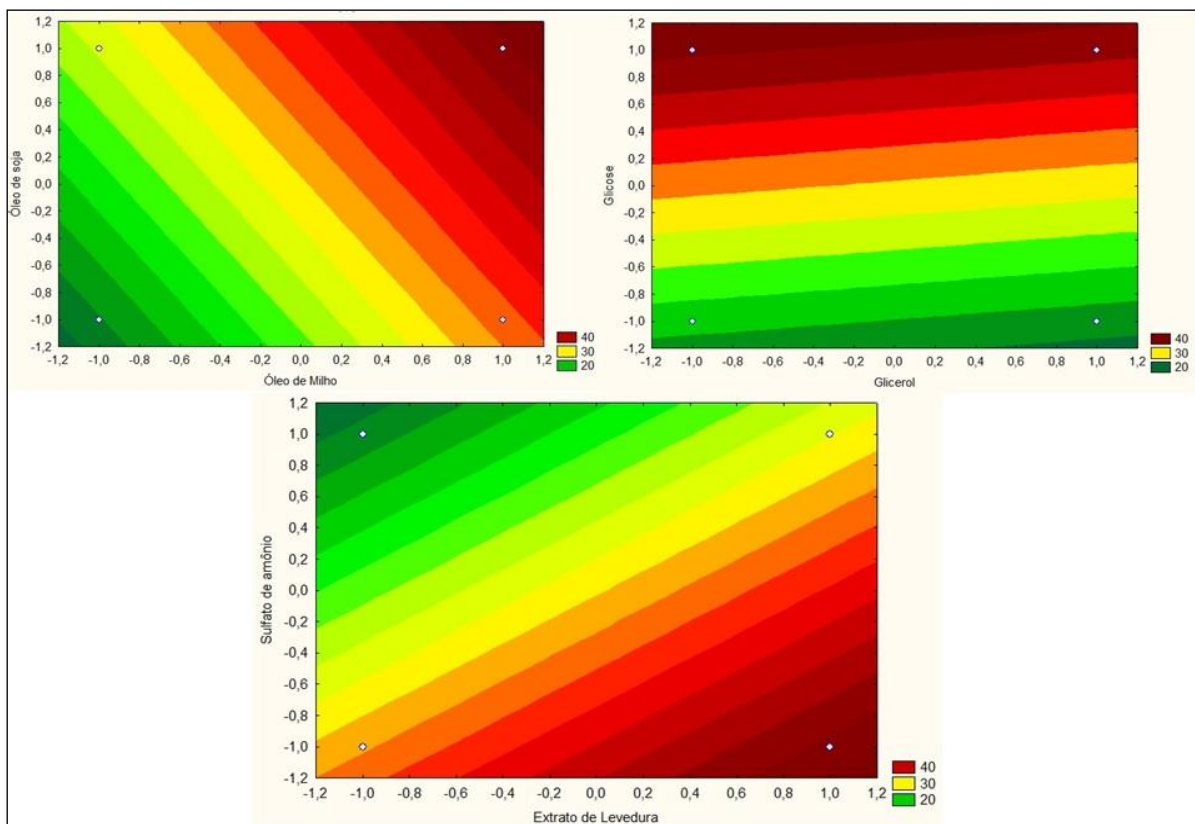


Figura 5- Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes na produção de biossurfactante (índice emulsificante).

Fonte: Programa computacional *Statística 8.0*.

Casas e Ochoa (1999) e Luna; Sarubbo e Campos-Takaki (2005) avaliaram a produção de biossurfactantes de diferentes espécies de leveduras e concluíram que, a concentração de glicose produziu um efeito positivo na produção de biossurfactante e promoveu um aumento do índice de emulsificação.

Accorsini (2010) estudou a produção de biossurfactante por um consórcio de leveduras, e ao final dos ensaios constatou que o óleo de soja e a glicose são excelentes fontes de carbono para a produção de biossurfactante.

Os resultados encontrados por Dikiti e colaboradores (2010) e Costa; Magnani e Castro-Gómez (2012) corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Estes autores obtiveram índices emulsificantes entre 49 a 64,3% e $62,5 \pm 0,88\%$, respectivamente, em extrato contendo manoproteína.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e com base nos resultados, a cepa *Kluyveromyces marxianus* (CCT - 3172) demonstrou potencial para produção de biossurfactante. Dentro do intervalo estudado, as condições ideais para a produção de biossurfactante por *K. marxianus* foram as utilizadas no experimento 12 constituído por: meio base (nitrato de amônio 0,1%, fosfato monopotássico 0,02%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,02%) adicionando-se 2% de óleo de soja; 20% de óleo de milho; 2% de glicerol; 10% de glicose; 0,1% de sulfato de amônio e 0,2% de extrato de levedura e incubado em mesa agitadora a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 144 horas.

Os resultados servem como base para o desenvolvimento de novas fermentações com outras fontes de nitrogênio e diferentes níveis de variação, em substituição ao sulfato de amônio, que foi o nutriente que causou um efeito negativo significativo no índice emulsificante.

7 REFERÊNCIAS

ACCORSINI, Fábio Raphael. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactante em fontes alternativas de carbono**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2010.

ALMEIDA, D. G de; SILVA, R. C. F. S da; BRASILEIRO, P. P. F.; LUNA, J. M de; SARUBBO, L. A.; Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. p. 2686-2693 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014** [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo, 2014.

AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H. M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture condition on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, México, v. 98, p. 237-240, 2007.

ANTUNES, Adriana Almeida. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo**. 2010. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

ANTUNES, Adriana A.; ARAÚJO, Hélvia W. C.; SILVA, Carlos A. A. da; COSTA-ALBUQUERQUE, Clarissa D. da; CAMPOS-TAKAKI, Galba M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n.3, p. 334-341, 2013.

BANAT, Ibrahim. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BARRIGA, Jeffrey A. T.; COOPER, David G.; IDZIAK, Edmund S.; CAMERON, David R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, 9.96-102, 1999.

BERTON, Claire; GENOT, Claude; MARIE-HÉLÈNE Ropers. Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.354, n.2, p.739-748, 2011.

BICCA, Flávio C.; FLECK, Leonardo C.; AYUB, Marco A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, Porto Alegre, v. 30, p. 231-236, 1999.

BOGNOLO, Giulio. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.152, p.41-52, 1999.

BOX, George E.P.; DRAPPER, Norman.R. **Empirical model-building and response surfaces**, New York: John Wiley e Sons,1987.

BRAVO, Claudia E. C.; CARVALHO, Eliana. P.; SCHWAN, Rosane F.; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H.; PILÓN, Lucimeire. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.24, p.103-136, 2000.

BRAVO, Claudia E. C.; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H. Seleção de fontes de enxofre para produção de enzimas celulolíticas por fungos anaeróbios. In: **Anais da VI Semana De Biotecnologia-Universidade Estadual De Londrina**, Londrina, 2010.

BRAVO-MARTINS, Claudia E. C.; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H.; SARROUH, Boutros F.; SILVA, Silvio S. Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungi cultivated in different conditions. **International Journal of Food Engineering**, v.5, p.1/14-13, 2009.

BUENO, Silvia Messias. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

BUENO, Gisele Ferreira. **Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. 2014. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

CAMERON, David R.; COOPER, David G.; NEUFELD, Ron J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p. 1420-1425, 1988.

CASAS, José A.; OCHOA, Félix G. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488-494, 1999.

COLLA, Luciane M.; COSTA, Jorge A. V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, p. 85-103, 2003.

COOPER, David G. Biosurfactants. **Microbial Science**, Canadá, v.3, n.5, p.145-149, 1986.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v.53, n.2, p. 224-229, 1987.

COSTA, Ariane G.; MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.34, n. 1, p. 77-84, Maringá, 2012.

DIKIT, Paweena; MANEERAT, Suppasil; MUSIKASANG, Hatairat; H-KITTIKUN, Aran. Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. **ScienceAsia**, v.36, p. 312-318, 2010.

DESAI, Jitendra; BANAT Ibrahim. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

FELSE, Arthur; SHAH, Vishal; CHAN, Jamie; RAO, Kandula; GROSS, Richard. Sophoroplid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 316-323, 2007.

FONTES, Gisele Cardoso. **Produção de Biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica***. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FONTES, Gizele C.; AMARAL, Priscilla F. F.; COELHO, Maria A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GOUVEIA, Ester R.; LIMA, Danielle P. A.; SOCORRO-DUARTE, Maria do; SOUZA-LIMA, Gláucia M. de; ARAÚJO, Janete M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 39-45, 2003.

GUDIÑO, José M. T.; CRISPÍN, José A. S.. Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* en cultivos sumergidos por carga. **Ciência**, Venezuela, v. 9, n. 3, p. 305-312, 2001.

LUNA, Juliana Moura de. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biosurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LUNA, Juliana M. de; SARUBBO, Leonie A.; CAMPOS-TAKAKI, Galba M. de. Biosurfactante produzido por uma nova linhagem de *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos: isolamento, caracterização e aplicação. In: LUNA, Juliana Moura de. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biosurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LUNA, Juliana Moura de. **Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biosurfactante de baixo custo Lunasan produzido por *Candida Sphaerica* UCP 0995**. 2010. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, p.I. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and biotechnology**, v.30, n.12, p.715-720, 2003.

MACIEL, Carla do C. S.; CAMPOS-TAKAKI, Galba M. de; GUSMÃO, Norma. Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eletrônica de Biologia**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 58-64, 2010.

MAKKAR, Randhir; CAMEOTRA, Swaranjit S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n.4, p.428-434, 2002.

MAIER, R.M, SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosyntheses and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, n. 5, p. 625-633, 2000.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 31, p. 63 – 67, 2003.

NITSCHKE, Marcia; COSTA, Siddhartha Georges V. A. de O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

POLMAN, J. K.; MILLER, K. S.; STONER, D. L.; BRECKENRIDGE, C. R. Solubilization of Bituminous and Lignite Coals by Chemically and Biologically Synthesized Surfactants. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 61. p. 11-17, 1994.

RON, Eliora; ROSENBERG, Eugene. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.3, p.249-252, 2002.

ROSSMANN, Maíke. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e manipueira**. 2008. 112 f. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

RUFINO, Raquel Diniz. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

RUFINO, Raquel. D.; SARUBBO, Leonie A.; CARRAZZONI, Edson P.; NETO, Benício B.; CAMPOS-TAKAKI, Galba M. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando resíduo da refinaria de óleo vegetal e extrato de levedura como substratos. In: RUFINO, Raquel Diniz. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

RUFINO, Raquel Diniz. **Produção otimizada do Biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* e aplicações biotecnológicas**. 2010. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SALGADO, Jaqueline Pereira. **Produção de biossurfactante por *Serratia Marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo**. 2013. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Curso Superior de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SANTOS, Danyelle Khadydja Felix dos. **Utilização de gordura animal e resíduo agroindustrial como substrato de baixo custo para produção de biossurfactante com potencial de aplicação na área ambiental.** 2013. 111 f. Tese (mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

SOUZA-SOBRINHO, Humberto Bezerra de. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida Sphaerica*.** 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SYLDATK, C.; WAGNER, F.; **Production of biosurfactant. em: biosurfactants and Biotechnology.** Apud FONTES, Gisele Cardoso. **Produção de Biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica*.** 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

TOREN, Amir; GEFEN Yuval; RON, Eliora Z.; ROSENBERG, Eugene. Solubilization of phenanthrene by recombinant protein bioemulsans. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.169-174, 2003.

VAZ, Gabrielli de Oliveira. **Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* usando farelo de trigo como substrato.** 2013. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

WOODS J. R.; CHARLES E. **Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media.** 2004. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Mississippi State University, Mississippi, 2004.