

BIOSURFACTANT EXTRACELLULAR PRODUCTION BY *Saccharomyces cerevisiae* USING ALTERNATIVES CARBON SOURCES

Naiara E. Kreling, Munise Zaparoli, Luciane M. Colla

Universidade de Passo Fundo - UPF

Laboratório de Fermentações, Campus I – Passo Fundo - RS

naiarakreling@hotmail.com, muni-zaparoli@hotmail.com, lmcolla2@gmail.com

Abstract. Biosurfactants are metabolites with surface activity, produced by microorganisms, is very similar to Synthetic surfactants. The diversity of these compounds makes them really attractive. The variety of industrial and biotechnological applications, making it promising due to its biodegradability and low toxicity. Economic aspects still are a barrier to large-scale production and must be optimized to enable industrial use. In this context, the aim of this study was to produce extracellular biosurfactants from the yeast *S. cerevisiae*, performing crops for 72 hours in media with different carbon sources (glycerol, soybean oil and diesel oil). Production was assessed using emulsifying activity and reducing of surface tension as analytical determinations. The results demonstrate that maximum emulsifying activity were obtained when used glycerol and soybean oil as inducers, and the inductor that caused reduction of surface tension was diesel oil.

Palavras-chave: *Bioprocess, Inducers.*

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são obtidos através de bioprocessos e característicos por possuírem porções hidrofílicas e hidrofóbicas. Possuem propriedades emulsificantes, dispersantes e de redução da tensão superficial [1,2]. São vantajosos se comparados aos surfactantes químicos por serem compostos biodegradáveis e de baixa toxicidade [3]. Estas características os tornam atrativos no setor industrial e ambiental, seja na

recuperação ou na biorremediação de contaminantes [4,5].

Entretanto, devido aos elevados custos de produção, ainda não são competitivos no mercado, sendo necessários estudos de otimização de processos e meios de cultivos utilizados, bem como o uso de microrganismos de mais fácil cultivo [6].

A produção de biossurfactantes por leveduras é bem conhecida para os gêneros *Candida* [7] e *Yarrowia* [8], mas existem poucos relatos da possibilidade de produção de biossurfactantes extracelulares pela levedura *S. cerevisiae* [9]. Esta levedura se destaca por ser de fácil obtenção e cultivo, possuir aplicação industrial já consolidada, fácil manipulação genética e atoxicidade [10].

Objetivou-se avaliar a influência das fontes de carbono simples e complexas na liberação de biossurfactantes extracelulares pela levedura *S. cerevisiae*.

2. METODOLOGIA

2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtida comercialmente, na forma liofilizada.

2.2 Meio de cultivo e delineamento experimental

Para avaliar os efeitos da concentração de sacarose e inductor oleoso na produtividade de atividade emulsificante máxima dos biossurfactantes extracelulares produzidos por *S. cerevisiae* foi utilizado um Delineamento experimental 2², conforme apresentado na Tabela 1.

O meio de cultivo foi preparado adicionando-se 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 1% de peptona (p/v) e sacarose conforme delineamento experimental (Tabela 1). Para estimular a produção de biossurfactantes extracelulares foram adicionados indutores oleosos (óleo de soja, óleo diesel e glicerol) aos meios de cultivo, em concentrações variadas conforme delineamento experimental (Tabela 1). O pH do meio de cultivo foi ajustado entre 6,0 a 6,5 e este foi esterilizado em autoclave por 21 min à 121 °C. As concentrações definidas foram baseadas em um estudo anteriormente realizado por Kreling et al. [11]. Um delineamento experimental foi realizado para cada tipo de indutor em estudo.

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo e estes inoculados com 1% (p/v) de levedura liofilizada e incubados por até 72 h sob agitação constante (100 rpm). As amostras foram coletadas nos tempos 0 h, 24 h e 72 h para determinação de atividade emulsificante e tensão superficial. As amostras retiradas no tempo amostral foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 min, sendo utilizado o meio fermentado livre de células para a avaliação da produção de biossurfactantes extracelulares.

Tabela 1. Delineamento experimental para a composição do meio de cultivo

Experimento	X ₁ – Sacarose (g.L ⁻¹)	X ₂ – Indutor (g.L ⁻¹)
E1	2 (-1)	15 (-1)
E2	10 (+1)	15 (-1)
E3	2 (-1)	45 (+1)
E4	10 (+1)	45 (+1)
E5	6 (0)	30 (0)
E6	6 (0)	30 (0)
E7	6 (0)	30 (0)

2.3 Determinações analíticas

As determinações das atividades emulsificantes água em óleo (A/O) foram realizadas de acordo com método proposto por Martins *et al.* [12].

A tensão superficial foi determinada no meio livre de células [13], de acordo com o método do anel (Du-Nuoy's ring method), com tensiômetro marca Biolin Scientific, modelo Sigma 702.

2.4 Tratamento dos dados e análise estatística

Os resultados obtidos para as atividades emulsificantes A/O permitiram o cálculo das produtividades máximas das emulsões durante o tempo de cultivo, de acordo com a Eq. (1). Os valores obtidos para a tensão superficial foram convertidos em um percentual de redução de tensão superficial, conforme Eq. (2). Os dados de atividade emulsificante foram avaliados de acordo com a metodologia de Planejamento de Experimentos, no qual se estima os efeitos principais e de interação de variáveis avaliadas.

$$Pm = At - Ai / t \quad (1)$$

$$R = (Ti - Tf / Ti) * 100 \quad (2)$$

Onde:

Pm = Produtividade Máxima (UE/h), *Af* = Atividade no tempo *t* (UE), *Ai* = Atividade no tempo inicial (UE), *t* = tempo (h).

R = Percentual de redução da tensão superficial (%), *Ti* = Tensão superficial do meio de cultivo no início do processo fermentativo, *Tf* = Tensão superficial do meio de cultivo no fim do processo fermentativo.

3. RESULTADOS

Nas produções de emulsões para os experimentos com o indutor glicerol, houve produção de atividade emulsificante em 24 h e 72 h. O experimento com maior produção de emulsões foi o E1, com 0,45 UE/h, em 24 h. No indutor óleo diesel, foram observadas produções somente em 24 h de ensaio, sendo a maior produtividade verificada 0,18 UE/h para o experimento E1. Quando utilizado óleo de soja, os experimentos E3 e E1 foram

os que apresentaram maiores produtividades de emulsões, de 0,30 UE/h e 0,25 UE/h respectivamente, ambos em 24 h. As maiores produtividades foram obtidas em experimentos que continham a menor concentração de sacarose (E1 e E3). A Fig. 1 apresenta as produtividades máximas obtidas nos sete ensaios realizados.

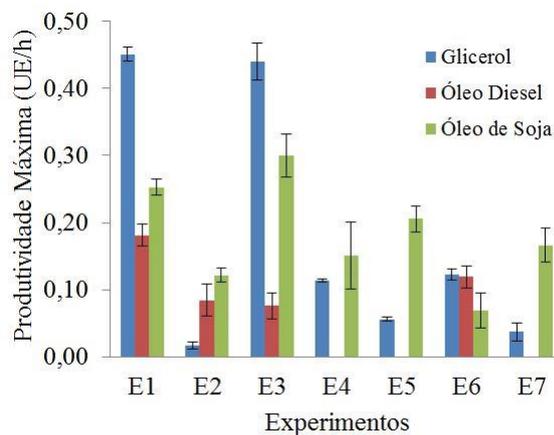


Figura 1 – Máximas Produtividades de atividade emulsificante A/O obtidas para os indutores glicerol, óleo de soja e óleo diesel.

A análise estatística realizada (Tabela 2) mostrou que a concentração de sacarose apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,05$) para todos os indutores testados, indicando que a adição de menores concentrações de sacarose no meio favorece a produção de compostos com atividades emulsificantes água em óleo (A/O). O efeito da concentração de óleo diesel também foi significativo e negativo ($p = 0,02$). A concentração dos demais indutores não apresentou efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a produção de compostos com atividade emulsificante água em óleo.

Tabela 2. Efeitos estimados das concentrações de sacarose (X_1) e indutor oleoso (X_2) sobre a produtividade de AE A/O

Indutor	Fatores	p (<0,05)	Efeito
Glicerol	X_1	0,00001	-0,4065
	X_2	0,60973	0,0180

	$X_1.X_2$	0,42647	0,0284
	Curvatura	0,00005	-0,3716
Óleo Diesel	X_1	0,04003	-0,0861
	X_2	0,02674	-0,0950
	$X_1.X_2$	0,77750	0,1055
	Curvatura	0,13064	-0,0912
Óleo de Soja	X_1	0,03172	-0,1361
	X_2	0,54270	0,0339
	$X_1.X_2$	0,80471	-0,0136
	Curvatura	0,16665	-0,1232

Em relação à tensão superficial, o maior percentual de redução para o indutor glicerol foi de 4,11% para o experimento E3, no qual em 72 h de bioprocessamento houve uma redução da tensão de 45,31 mN/m para 43,45 mN/m. Quando utilizado óleo diesel como fonte complexa de carbono, a redução foi de 7,96% em 72 h de produção, para o experimento E5, a maior redução para todos os experimentos testados (30,04 mN/m para 27,65 mN/m). Para o óleo de soja, a maior redução foi de 7,27% no experimento E5, com tensão superficial reduzida de 34,41 mN/m para 31,91 mN/m, nas primeiras 24 h de produção.

4. CONCLUSÕES

Os indutores que apresentaram maiores produtividades de atividade emulsificante e maior produção de biossurfactantes foram os indutores glicerol e óleo de soja, respectivamente. A redução da tensão superficial foi maior quando utilizado óleo diesel como indutor.

AGRADECIMENTOS

A UPF, FAPERGS, CAPES e CNPq pelos recursos e bolsas de estudo disponibilizados.

REFERÊNCIAS

- [1] J.D. Desai and M.I. Banat, "Microbial production of surfactants and their commercial potential," *Microbiology*

- and Molecular biology reviews, vol. E-61, no 1, 1997, pp. 47-64.
- [2] K.S. Satpute, A.G. Banpurkar, K.P. Dhakephalkar, I. M. Banat and B.A. Chopade, "Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review," *Critical reviews in biotechnology*, vol. E-30, no. 2, 2010, pp. 127-144.
- [3] G.C. Fontes, P.F.F. Amaral e M.A.Z. Coelho, "Produção de biossurfactante por levedura," *Química Nova*, vol. E-31, no. 8, 2008, pp. 2091-2099.
- [4] M. Pacwa-Płociniczak, G.A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget and S.S. Cameotra, "Environmental applications of biosurfactants: recent advances," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. E-12, no. 1, 2011, pp. 633-654.
- [5] M.J. Chaprão, I.N.S. Ferreira, P.F. Correa, R.D. Rufino, J.M. Luna, E.J. Silva and L.A. Sarubbo, "Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. E-18, no. 6, 2015, pp. 471-479.
- [6] L.V. Araujo, D. M. G. Freire e M. Nitschke, "Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas," *Química Nova*, vol. E-36, no. 6, 2013, pp. 848-858.
- [7] J.M. Luna, R.D. Rufino, A.M.A.T. Jara, P.P.F. Brasileiro and L.A. Sarubbo, "Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. E-480, 2014, pp. 413-418.
- [8] R. K. S. Morais, A. K. S. Abud, "Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo," *Scientia Plena*, vol. E-8, no. 10, 2013.
- [9] V.A. Alcantara, I.G. Pajares, J.F. Simbahan, M.L.D. Rubio, "Substrate dependent production and isolation of an extracellular biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae* 2031," *Philipp. J. Sci*, vol. E-141, 2012, pp. 13-24.
- [10] G.C. Fontes, P.F.F. Amaral, M.A.Z. Coelho, "Produção de biossurfactante por levedura," *Química Nova*, vol. E-31, no. 8, 2008, pp. 2091-2099.
- [11] N.E. Kreling, M. Zaparoli e L.M. Colla, "Produção de biossurfactantes intra e extracelulares a partir de *saccharomyces cerevisiae*," em XX SINAIFERM - XI SHEB, 33593, pp. 2447-2816.
- [12] G. V. Martins, S. J. Kalil, Bertolin, T and J. A. V. Costa, "Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor," *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. E-61, no.9-10, 2006, pp. 721-726.
- [13] A. B. J. MATSUURA, "Produção e caracterização de biossurfactantes visando à aplicação industrial e em processos de biorremediação," Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), 2004.