

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *CANDIDA LIPOLYTICA*
NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES, NOS PROCESSOS
DE REMOÇÃO E BIOSSORÇÃO DO PIRENO (DERIVADO DO
PETRÓLEO)**

MABEL HANNA VANCE-HARROP

Recife

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *CANDIDA LIPOLYTICA*
NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES, NOS PROCESSOS
DE REMOÇÃO E BIOSSORÇÃO DO PIRENO (DERIVADO DO
PETRÓLEO)**

Tese apresentada ao Curso de PósGraduação em
Biologia de Fungos da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos, para
obtenção do título de Doutor em Biologia de
Fungos.

Área de Concentração: Micologia aplicada.

Autora: MABEL HANNA VANCE-HARROP

Orientadora: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS-TAKAKI

Recife, PE

2004

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *CANDIDA LIPOLYTICA* NA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES, NOS PROCESSOS DE
REMOÇÃO E BIOSSORÇÃO DO PIRENO (DERIVADO DO PETRÓLEO)**

Mabel Hanna Vance-Harrop

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki (Orientadora)

Departamento de Química - NPCIAMB/UNICAP, Recife, PE

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Departamento de Antibióticos - UFPE, Recife, PE

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende

Departamento de Microbiologia, ICB - UFMG, Belo Horizonte, MG

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE, Recife, PE

Profa. Dra. Kaoru Okada

Departamento de Biologia - NPCIAMB/UNICAP, Recife, PE

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas e Instituições contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste Curso. A todas agradeço pelo apoio nunca negado nos momentos difíceis:

- Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – LAPA/Recife;
- Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.
- Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, pelo acesso ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB);
- Ao CNPq, CNPq/CTPETRO, FINEP/CTPETRO, PRONEX, pelo financiamento dos experimentos realizados;
- À Professora Galba, pela orientação e principalmente, pelo incentivo e oportunidade de realizar este trabalho;
- Ao Professor Marcelo Magalhães, pelo incentivo e por todos os conhecimentos transmitidos durante a minha vida profissional;
- À Professora Norma Buarque de Gusmão, pela contribuição na realização deste trabalho;
- Ao Professor Benício Barros Neto, pelas análises estatísticas, e pela atenção com que sempre me tratou;
- À banca examinadora pelas valiosas sugestões;
- Aos secretários do curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Márcio Eustáquio e Luís Carlos, pela boa vontade e agilidade, quando precisei;

- Aos técnicos do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana e Sonia Maria de Souza, pelo auxílio durante a fase experimental;
- Aos colegas de curso, Ubirany, Cíntia, Gladstone, Ana Cristina, Bereneuza e Eurípedes, pelo companheirismo em todas as etapas deste curso;
- Aos colegas de laboratório, Ricardo Kenji Shiosaki, Sandra Tereza Ambrósio, Luciana Franco, Mariluce Pereira Barbosa , Mabel Calina Paz e Clarissa Daisy de Albuquerque, pela convivência;
- Ao Professor, amigo e conselheiro Cláudio de Moraes Andrade, por todos os inestimáveis ensinamentos ministrados ao longo da minha vida acadêmica e profissional;
- À minha família, pelo seu apoio e compreensão em todos os momentos.
- A todos aqueles que posso ter esquecido de mencionar, mas que foram amigos e/ou ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO GERAL	01
REVISÃO DA LITERATURA	04
1. Biossurfactantes	04
1.1. Estrutura e origem microbiológica.....	05
1.2. Propriedades.....	08
1.3. Produção de biossurfactantes.....	08
1.3.1. Fisiologia e genética.....	08
1.3.2. Biossíntese.....	09
1.3.3. Regulação.....	10
1.3.4. Caracterização genética.....	11
1.3.5. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes	12
1.3.6. Produção de biossurfactantes por transformação	15
1.4. Aplicação dos biossurfactantes	17
2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs): estrutura química e propriedades..	20
2.1. Origem dos HAPs.....	20
2.2. Importância ambiental dos HAPs	23
2.2.1. Toxicidade	25
2.3. Degradação microbiológica	26
2.3.1. Biorremediação	33
3. Biossorção	35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO I	
-New Bioemulsifiers Produced by <i>Candida lipolytica</i> using D-Glucose and Babassu Oil as Carbon Sources	53
CAPÍTULO II	
-Evaluation of a Semidefined Medium for the Production of Biosurfactant by <i>Candida lipolytica</i> Using a Factorial Design	58
CAPÍTULO III	
-Remotion of Pyrene by <i>Candida lipolytica</i> under Mixed Substrates Conditions	84
CAPÍTULO IV	
-Biossorção do Pireno por <i>Candida lipolytica</i> Imobilizada	111
CONCLUSÕES GERAIS	124
ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Molécula de um biossurfactante	04
Figura 2. Estruturas típicas de biossurfactantes	07
Figura 3. Estruturas de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	21

CAPÍTULO I

Figure 1. Growth (○) of <i>Candida lipolytica</i> and pH (Δ) of YSW-G (A), YSW-G ₁ (B), YSW-B ₂ (C), and YSW-B ₃ (D) media incubated at 28 ⁰ C for 240 hours, 150 rpm.....	56
--	----

CAPÍTULO II

Figure 1. Response surface of biosurfactant production by <i>Candida lipolytica</i> in emulsification activity (AE) estimated as an absorbance at 540 nm for the 2 ⁽⁵⁻¹⁾ design experiments. Symbol: ● shows the runs that obtained the high emulsification activity (AE).....	77
---	----

Figure 2. Pareto chart of standardized estimated effects for the five factors tested in the first design for biosurfactant production by <i>Candida lipolytica</i> . The point at which the effects estimates were statistically significant (at P= 0.05) is indicated by the vertical solid line	78
---	----

Figure 3. Responses for the full 2 ⁴ design of experiments, estimated as an absorbance at 540 nm for an emulsification activity (AE). Symbol: ● show the run 12 as the high AE....	79
---	----

Figure 4. Pareto chart of the effects calculated from the responses in Figure 3 of the full factorial design (2 ⁴) for biosurfactant production by <i>Candida lipolytica</i> . The point at which the effects estimates were statistically significant (at P=0.05) is indicated by the vertical solid line....	80
--	----

Figure 5. Normal probability plot of the effects calculated for the full 2^4 design of experiments for biosurfactant production by *Candida lipolytica*. 81

Figure 6. Responses for the full 2^3 design of experiments, for the biosurfactant production by *Candida lipolytica* estimated as an absorbance at 540 nm, for an emulsification activity (AE). Symbol: ● shows the run 8 as the high AE. 82

Figure 7. Pareto chart of the effects calculated from the responses in Figure 6, of a full 2^3 design for biosurfactant production by *Candida lipolytica*. The point at which the effect estimates were statistically significant (at $p=0.05$) is indicated by the vertical solid line... 83

CAPÍTULO III

Figure 1. Profile of cell growth and pH of *Candida lipolytica* in medium I (yeast extract $5,5 \text{ gl}^{-1}$, urea $3,75 \text{ gl}^{-1}$, potassium phosphate $5,5 \text{ gl}^{-1}$) supplemented with babassu oil $62,5 \text{ ml l}^{-1}$, and pyrene 10mg l^{-1} . Symbols: ● pH determinations. ■ The growth studies were performed by colony forming units per ml^{-1} . Errors bars indicate the standard deviation on three independent experiments. 106

Figure 2. Profile of cell growth and pH of *Candida lipolytica* in medium II (yeast extract $5,5 \text{ gl}^{-1}$, urea $3,75 \text{ gl}^{-1}$, potassium phosphate $5,5 \text{ gl}^{-1}$) supplemented with D-glucose 10 gl^{-1} , and pyrene 10mg l^{-1} . Symbols: ● pH determinations. ■ The growth studies were performed by colony forming units per ml^{-1} . Errors bars indicate the standard deviation on three independent experiments. 107

Figure 3. Profile of cell growth and pH of *Candida lipolytica* in medium II (yeast extract $5,5 \text{ gl}^{-1}$, urea $3,75 \text{ gl}^{-1}$, potassium phosphate $5,5 \text{ gl}^{-1}$) supplemented with sucrose 10 gl^{-1} , and pyrene 10mg l^{-1} . Symbols: ● pH determinations. ■ The growth studies were performed by colony forming units per ml^{-1} . Errors bars indicate the standard deviation on three independent experiments..... 108

Figure 4. Profile of cell growth and pH of *Candida lipolytica* in medium IV (yeast extract , 5,5 gl^{-1} , urea 3,75 gl^{-1} , potassium phosphate 5,5 gl^{-1}) supplemented with D-glucose 10 gl^{-1} , babassu oil 62,5 ml.l^{-1} and pyrene 10mg l^{-1} . Symbols: ● pH determinations. ■ The growth studies were performed by colony forming units per ml^{-1} . Errors bars indicate the standard deviation on three independent experiments..... 109

Figure 5. Profile of cell growth and pH of *Candida lipolytica* in medium V (yeast extract 5,5 gl^{-1} , urea 3,75 gl^{-1} , potassium phosphate 5,5 gl^{-1}) supplemented with sucrose 10 gl^{-1} , babassu oil 62,5 ml.l^{-1} and pyrene 10mg l^{-1} . Symbols: ● pH determinations. ■ The growth studies were performed by colony forming units per ml^{-1} . Errors bars indicate the standard deviation on three independent experiments..... 110

CAPÍTULO IV

Figura 1. Capacidade máxima de biossorção do pireno por *Candida lipolytica* imobilizada em mg.g^{-1} . Os dados são valores da média de determinações em duplicata..... 122

Figura 2. Concentração residual do pireno em percentual, em 25 ml de eluente; de colunas com 100, 200, e 300 mg de *Candida lipolytica* imobilizada..... 123

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Principais biossurfactantes e sua origem microbiológica	06
---	----

CAPÍTULO II

Table 1. Concentration levels of surfactant culture media for surfactant production.....	72
--	----

Table 2. Fractional factorial 2^{5-1} design (in the coded values specified in Table 1) used to evaluate biosurfactant production by <i>Candida lipolytica</i>	73
--	----

Table 3. Full 2^4 follow-up design, excluding ammonium sulfate from the culture media for biosurfactant production. Coding as given in Table 1	74
--	----

Table 4. Full 2^3 factorial design, excluding ammonium sulfate and urea. Coding as given in Table 1.....	75
--	----

Table 5. Model fitting results for production of biosurfactants by <i>Candida lipolytica</i>	76
---	----

CAPÍTULO III

Table 1. Composition of media used for biodegradation of pyrene by <i>Candida lipolytica</i> ..	104
---	-----

Table 2. Remotion of pyrene by <i>Candida lipolytica</i> during the growth in different media....	105
---	-----

RESUMO

Em prévios estudos, *Candida lipolytica* IA 1055, demonstrou excelente potencial na produção de biossurfactantes com habilidade de emulsificação, em meios de cultura de baixo custo. Considerando o potencial biotecnológico de *C. lipolytica*, novas investigações foram realizadas utilizando os meios de cultura de baixo custo, a base de água do mar, adicionados de óleo de babaçu e glicose como controle da fonte de carbono. Observou-se maior produção de biossurfactantes com os meios Yeast Salt Water-Babaçu (YSW-B²) e Yeast-Salt Water-Babaçu (YSW-B³) cujas moléculas produzidas apresentaram excelente capacidade de emulsificação, sendo consideradas como novos bioemulsificantes, constituídos quimicamente por carboidratos, proteínas e lipídeos. A partir dos meios selecionados foi realizado um planejamento fatorial de dois níveis com cinco fatores (extrato de levedura, sulfato de amônio, uréia, fosfato de potássio e óleo de babaçu), com a finalidade de testar a sua influência sobre a produção de biossurfactante, através dos efeitos estatisticamente combinados. Os resultados obtidos sugeriram maior produção com os níveis utilizados do extrato de levedura, fosfato e da uréia nos seus valores superiores, enquanto que o da amônia, foi fixado em seu valor inferior. Quanto a fonte de carbono, o óleo de babaçu, os níveis fracionários não indicaram um efeito significativo sobre a resposta, ou seja, o aumento da produção de biossurfactante. As condições dos meios de cultura selecionados pelo planejamento fatorial foram utilizadas para a realização de estudos com substratos mistos (solúvel e insolúvel) para os processos de remoção e biossorção do pireno (derivado do petróleo) em cinco diferentes meios de cultura. Os resultados das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), demonstraram uma alta taxa de remoção do pireno nos meios I e IV, com percentuais de 99,02% e 97,51%, respectivamente. Estudos subseqüentes, com a biossorção do pireno foram realizados utilizando a biomassa de *C. lipolytica* imobilizada em álcool polivinil, como matriz inerte. Várias concentrações de biomassa (100, 200 e 300 mg) foram imobilizadas e empacotadas em colunas para avaliação do processo de biossorção do pireno. Os eluentes (água e acetato de etila) e as frações obtidas foram analisados por CLAE. Os resultados obtidos sugerem que a biomassa imobilizada de *C. lipolytica* apresenta grande potencial nos processos de biossorção do pireno tendo em vista o baixo custo, da produção e da imobilização da biomassa. Estes resultados indicam que a capacidade máxima de biossorção do pireno foi de 86,91; 44,62 e 29,43 mg g⁻¹, respectivamente para as colunas com 100 mg, 200 mg e 300 mg de biomassa.

ABSTRACT

In previous studies *Candida lipolytica* IA1055 has shown excellent potential in biosurfactant production, demonstrating emulsifying ability in low-cost culture media. Taking that into consideration, investigations were performed utilizing low-cost culture media in basal seawater supplemented with babassu oil and glucose as control of carbon sources. The highest biosurfactant production was observed in media Yeast Salt Water – Babassu (YSW-B²) and Yeast Salt Water – Babassu (YSW-B³), in which the molecules produced showed excellent emulsification activity. These molecules were considered new bioemulsifiers, chemically consisting of carbohydrate, protein and lipid. After media selection, a two-level factorial design with five factors (yeast extract, ammonium sulfate, urea, potassium phosphate and babassu oil) was performed, in order to test their influence over biosurfactant production, through statistically combined effects. The results suggested that higher production occurred with yeast extract, urea and potassium phosphate in their highest levels, and ammonium in its lowest level. As for the carbon source (babassu oil), the results indicated that its level was independent to the biosurfactant production. The culture media conditions, selected by the factorial design, were used to perform studies with mixed substrates (soluble and insoluble) for the processes of removal and biosorption of pyrene (petroleum derivative) using five different culture media. The results of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses demonstrated a high removal rate of pyrene in media I and IV with 99.02% and 97.51% percentage, respectively. Subsequential studies were performed with the biosorption of pyrene utilizing *Candida lipolytica* immobilized biomass in polyvinyl alcohol as inert matrix. Biomass concentrations (100, 200 and 300 mg) were immobilized and packed in columns for evaluation of pyrene biosorption process. The eluents (ethyl acetate and water) and the fractions obtained were analyzed by HPLC. The results obtained suggested that the *Candida lipolytica* immobilized biomass presented great potential in pyrene biosorption processes because of its low cost. The results indicated that the maximum biosorption capacity of pyrene was 86.91 , 44.62 and 29.43 mg l⁻¹ respectively for the 100 mg, 200 mg and 300 mg columns.