

## **Padronização do Inóculo na Produção de Soforolipídeos por *Candida bombicola* ATCC 22214 Utilizando Semente de Girassol na Fermentação em Estado Sólido**

**Marcos Roberto de Oliveira<sup>1</sup>, Doumit Camilios-Neto<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina – Departamento de Tecnologia de Alimentos – CEP 86036-370 - Londrina – Paraná - E-mail: marcosrobertodeoliveira@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10.011 – CEP 86.057-970 Londrina – Paraná

### **RESUMO**

*Os soforolipídeos (SLP) são biossurfactantes produzidos principalmente pela levedura Candida bombicola. Possuem aplicações em áreas como: Alimentos; Biomédica; Biorremediação; Cosméticos; Farmacêutica e Nanotecnologia. A produção em larga escala e o custo relativamente elevado, ainda são um grande obstáculo para os SLP tornarem-se competitivos economicamente. O desenvolvimento de novas estratégias e processos para a produção de SLP é essencial para diminuir custos e aumentar a produção. Dentre as estratégias de produção a fermentação em estado sólido é um processo que utiliza substratos naturais que atuam como fonte de nutrientes e suporte físico. Uma das principais etapas do desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos é a padronização do inóculo. Assim, o presente trabalho avaliou a produção de SLP relacionada ao inóculo inicial. O inóculo que apresentou a maior produção de SLP foi aquele contendo 162,360 mg de células para cada 5 g de substrato sólido, com uma produção de 13,306 mg de SLP/g substrato.*

**Palavras-chave:** *Candida bombicola*, soforolipídeos, fermentação em estado sólido.

### **INTRODUÇÃO**

Os biossurfactantes possuem propriedades muito semelhantes aos surfactantes de origem petroquímica e apresentam diversas vantagens como baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Os SLPs são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos produzidos principalmente pela levedura *Candida bombicola*. Estruturalmente são compostos por um dissacarídeo sefarose (2'-O-β-D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose) ligado (ligação β-glicosídica) a uma longa cadeia de ácido graxo (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961). Os SLPs possuem um grande potencial para aplicações em diversas áreas como: Agricultura, Alimentos, Biomedicina, Biorremediação, Cosméticos e Recuperação Melhorada de Petróleo (OLIVEIRA et al., 2015).

Apesar das inúmeras vantagens e aplicações que os biossurfactantes possuem sobre os surfactantes sintéticos, a produção em larga escala e o custo relativamente elevado ainda são um grande obstáculo para a competitividade econômica (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Duas estratégias básicas podem ser utilizadas para superar as barreiras dos altos custos: (a) o uso de substratos de baixo custo e de resíduos para a formulação de meios de fermentação, (b)

desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimizados das condições de cultivo e recuperação (máxima produção com máxima recuperação) (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Sementes de girassol (oleaginosas) contêm altos níveis de ácidos graxos que são essenciais para a produção de SLP e nas fermentações submersas, altas produções de SLP são obtidas quando se utiliza o óleo de girassol (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999; KLEKNER; KOSARIC; ZHOU, 1991). No desenvolvimento de modelos para a fermentação em estado sólido (FES) diversos fatores devem ser considerados como inóculo, composição da solução umedecedora, temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, propriedades e natureza do substrato sólido (SUBRAMANIAM; VIMALA, 2012; SINGHANIA, 2009). A padronização do inóculo é uma das primeiras e mais importantes etapas que ocorre durante o desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos, pois o inóculo está diretamente relacionada com a produtividade (WEBB, C.; KAMAT, 1993).

Considerando-se: as diversas vantagens que os biossurfactantes apresentam sobre os surfactantes de origem química; o amplo campo de aplicação dos SLPs; os altos custos para a produção em larga escala de SLPs, a grande disponibilidade de oleaginosas em nossa região e a importância da padronização do inóculo o presente trabalho avaliou e padronizou o inóculo para a produção de SLP por *Candida bombicola* ATCC 22214 utilizando sementes de oleaginosas (girassol) através de fermentação em estado sólido.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismo:** O microrganismo utilizado foi a levedura *Candida bombicola* ATCC 22214. A cepa foi mantida em meio sólido realizados repiques mensais e conservadas sob refrigeração a 4 °C (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

**Inóculo:** O meio de inóculo contém em g.L<sup>-1</sup>: glicose (100), extrato de levedura (10) e uréia (1), pH final de 6,0. Ao meio foi inoculado uma alça de platina cheia e incubado por 48 h a 30 °C, em shaker orbital a 180 rpm (DAVEREY, PAKSHIRAJAN, 2009). Ao final o meio foi centrifugado a 12.500 x g por 10 min a 4 °C. O crescimento celular foi calculado espectrofotometricamente (D.O.<sub>600</sub>).

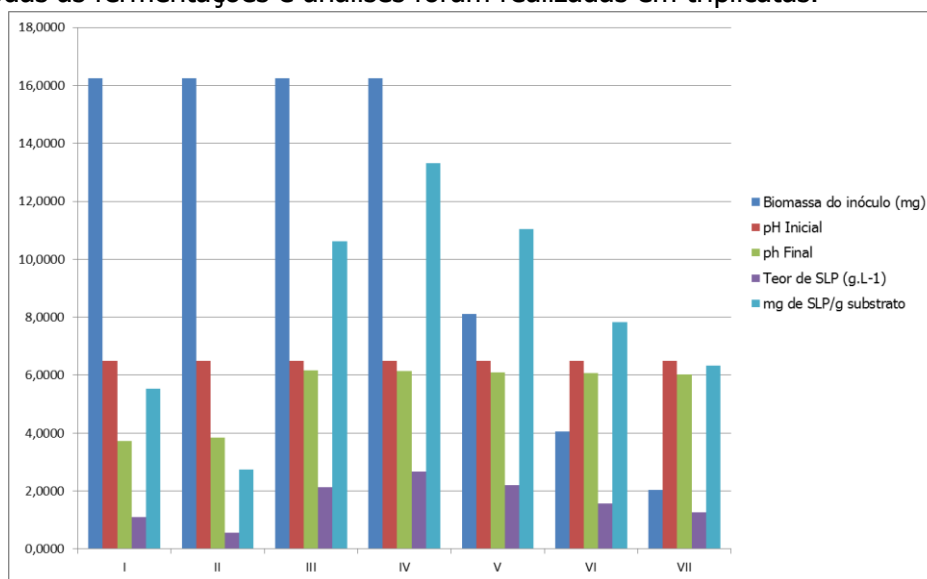
**Substrato sólido e padronização do inóculo:** O substrato sólido utilizado foi composto por 5 g de sementes de girassol trituradas e tamizadas com tamiz - mesh 8 (malha de 2,38 mm). Os substratos foram umedecidos com 8,8 mL de solução umedecedora (100 g.L<sup>-1</sup> de glicose) contendo o inóculo em diversas proporções de meio fermentado : solução umedecedora (Tabela 1). Os ensaios foram incubados em estufa bacteriológica a 30 °C, por 7 dias.

**Tabela 1 – Variações do teor de inóculo relacionados à produção de SLP.**

| Ensaios |                                    | Girassol (g) | Volume do meio fermentado (mL) | Volume de inóculo (mL) ressuspensão em solução umedecedora | Solução umedecedora (mL) | Biomassa presente no inóculo (mg) |
|---------|------------------------------------|--------------|--------------------------------|--|--------------------------|-----------------------------------|
| I       | Inóculo 100% - Sem girassol        | 0            | 8,80                           |  |                          | 162,360                           |
| II      | Inóculo 100% - Sem girassol        | 0            | 8,80                           | 8,80   |                          | 162,360                           |
| III     | Inóculo 100% - Meio fermentado     | 5            | 8,80                           |  |                          | 162,360                           |
| IV      | Inóculo 100% - Solução umedecedora | 5            | 8,80                           | 8,80   |                          | 162,360                           |
| V       | Inóculo 50% - Solução umedecedora  | 5            | 4,40                           | 4,40   | 4,40                     | 81,180                            |
| VI      | Inóculo 25% - Solução umedecedora  | 5            | 2,20                           | 2,20   | 6,60                     | 40,590                            |
| VII     | Inóculo 10% - Solução umedecedora  | 5            | 0,88                           | 0,88   | 7,92                     | 20,295                            |

**Interrupção dos cultivos:** Os cultivos foram interrompidos adicionando-se 25 mL de água destilada, homogeneizados em agitador orbital por 1 h, a 25 °C e 200 rpm. A suspensão foi filtrada em gaze para a retirada do resíduo das tortas. O filtrado foi centrifugado a 12.500 x g por 10 min a 4 °C para obter o extrato livre de células (ELC).

**Extração e quantificação de soforolipídeos:** O ELC foi extraído três vezes com 25mL de acetato de etila. A fase orgânica foi evaporada em rota evaporador. Posteriormente, os SLP foram separados dos ácidos graxos presentes através da extração com 25 mL de hexano e 25 mL de uma solução metanol: água (4:1) (PALME et al., 2010, modificado). A fase metanol: água foi evaporada em estufa a 85 °C. O teor total de SLP foi determinado por análise gravimétrica e expresso em miligramas de soforolipídeos por grama substrato sólido (SOLAIMAN et al, 2004). Todas as fermentações e análises foram realizadas em triplicatas.



**Figura 1** – Produção de SLP em diferentes concentrações de inóculo inicial.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de produção de SLP estão demonstrados na figura 1. Os ensaios I e II não contem suporte sólido e serviram como controle para o experimento, onde as mais baixas produções foram observadas. Os baixos níveis de produção nestes ensaios, provavelmente estejam relacionados à ausência de uma fonte hidrofóbica, já que esta é essencial para uma maior produção de SLP (ASMER et al.; 1988). No ensaio III as fontes hidrofílicas (glicose da solução umedecedora) e hidrofóbicas (triacilgliceróis da semente de girassol) estão presentes e ocorre um aumento significativo de aproximadamente 100% na produção de SLP (5,529 para 10,617 mg de SLP/g substrato). O ensaio IV apresentou a maior produção 13,306 mg de SLP/g substrato, possivelmente devido a três fatores: (a) presença de glicose como solução umedecedora (a melhor fonte hidrofílica para a produção de SLP), (b) presença de uma fonte hidrofóbica (sementes de girassol) (DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1994) e (c) maiores concentrações de inóculo refletem maiores produções (GAO et al., 2012). Podemos observar na

Tabela 1 e na Figura 1 que nos ensaios IV, V, VI e VII existe uma relação direta entre biomassa presente no inóculo e produção de SLP.

### CONCLUSÕES

A maior produção de SLP foi de 13,306 mg de SLP/g substrato para o inóculo de 162,30 162,360 mg de células de *Candida bombicola* ATCC 22214 utilizando somente glicose 10% como solução umedecedora. Posteriormente serão padronizados solução umedecedora, temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, propriedades da cama, natureza do substrato sólido.

**Agências de Fomento:** Capes, CNPq, Fundação Araucária.

### REFERÊNCIAS

- ASMER, H.J., et al. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. **JAACS**, v. 65, n. 9, p. 1460-1466, 1988.
- CASAS, J.A.; GARCÍA DE LARA, S.; GARCÍA-OCHOA, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 3, p. 221-229, 1997.
- Daverey, A.; Pakshirajan, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499-504, 2009.
- Davila, A.M.; Marchal, R.; Vandecasteele, J. P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n.4, p. 249-257, 1994.
- GAO, R.; FALKEBORG, M.; XU, X.; GUO, Z. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1103-1111, 2013.
- GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846-855, 1961.
- KLEKNER, V.; KOSARIC, N.; ZHOU, Q. H. Sophorose lipids produced from sucrose. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 345-348, 1991.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 19, 2011.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.
- NUÑEZ, A.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; SOLAIMAN, D. K. Y. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. **Chromatographia**, v. 53, p. 673-677, 2001.
- OLIVEIRA, M. R., et al. Review : Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)**, v. 6, n. 2, p. 161-174, 2015.
- PALME, O., et al. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 663-673, 2010.
- SINGHANIA, R. R., et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.
- SOLAIMAN, D. K. Y., et al. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 15, p. 1241-1245, 2004.
- SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.
- WEBB, C.; KAMAT, S. P. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 308-312, 1993.