

## **Produção de Soforolipídeos por *Candida bombicola* ATCC 22214: Padronização do Inóculo na Utilização Células Imobilizadas em Alginato de Sódio**

**Marcos Roberto de Oliveira<sup>1</sup>, Ana Paula Novelli<sup>2</sup>, Doumit Camilios-Neto<sup>2</sup>, Jéssica Prince Fontes de Almeida<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 sofrorolipídeos são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos, produzidos principalmente pela levedura osmofílica *Candida bombicola*. Eles possuem aplicações em diversas áreas como: ambiental, cosmética, farmacêutica e nanotecnológica. Apesar das inúmeras aplicações que possuem a produção em larga escala e o custo relativamente elevado ainda são os grandes obstáculos para sua competitividade econômica. O desenvolvimento de bioprocessos eficientes é uma das formas de se superar estes obstáculos. Dentre estes bioprocessos a imobilização de células possibilita um aumento de produção devido à alta concentração de biomassa e diminuição de custos devido à reutilização desta biomassa. A padronização de inóculo é uma das etapas mais importantes na otimização de processos fermentativos. Portanto, presente trabalho avaliou a produção de SLP relacionada ao inóculo inicial de células de *Candida bombicola* imobilizadas em alginato de sódio. O inóculo a 5% (massa celular/volume Alginato de sódio) apresentou a produção de SLP mais elevada (4,7973 g.L<sup>-1</sup>).*

**Palavras-chave:** *Candida bombicola*, sofrorolipídeos, imobilização celular, Alginato de sódio.

### **INTRODUÇÃO**

Os sofrorolipídeos (SLP) são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos, compostos por um dissacarídeo sefarose (2'-O-β-D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose) unidos por ligação β-glicosídica a uma longa cadeia de ácido graxo produzidos por diversas leveduras não patogênicas, destacando-se a levedura *Candida bombicola* ATCC 22214 (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961). Os SLP 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 SLP são um dos mais promissores biossurfactantes conhecidos e possuem um grande potencial para aplicações em diversas áreas como: ambiental, cosmética, farmacêutica e nanotecnológica (OLIVEIRA et al., 2015).



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

A produção em larga escala e o custo relativamente elevado ainda são um grande obstáculo para a competitividade econômica dos SLP perante os surfactantes sintéticos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Este obstáculo pode ser transposto através do desenvolvimento de bioprocessos eficientes objetivando máxima produção e consequentemente diminuição de custos (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

A imobilização celular em alginato de sódio é uma técnica de baixo custo, simples e grande biocompatibilidade (PAULO; ASSIS; SANTOS, 2003). Esta técnica possibilita um aumento de produção devido à alta concentração de células presentes no meio de fermentação e diminuição de custos devido à reutilização destas células no processo fermentativo (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). No desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos uma das etapas iniciais e mais importantes é a padronização do inóculo, pois o inóculo esta diretamente relacionada com a produtividade (WEBB, C.; KAMAT, 1993).

Considerando o amplo campo de aplicação dos SLPs, os altos custos para a produção em larga escala de SLPs e o processo de imobilização celular em alginato de sódio, o presente trabalho avaliou e padronizou o inóculo para a produção de SLP através de células imobilizadas de *Candida bombicola* ATCC 22214 em alginato de sódio.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismo:** A cepa de *Candida bombicola* foi mantida em meio sólido, repicadas mensalmente e conservadas sob refrigeração a 4 °C (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

**Inóculo:** O meio de inóculo contem em g.L<sup>-1</sup>: 100 g de glicose, 10 g de extrato de levedura e 1 g de uréia, pH final de 6,0. O meio foi inoculado utilizando uma alça de platina 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>).

**Imobilização celular:** Após a centrifugação as células de *Candida bombicola* foram misturadas lentamente com alginato de sódio nas proporções (peso células úmidas/ volume de Alginato de sódio) de 2,5%, 5,0% e 7,5%. Posteriormente esta suspensão foi gotejada através de bomba peristáltica em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1M. Logo após as esferas foram lavadas em solução salina e inoculadas na proporção de 10% volume de esferas/volume do meio de fermentação.

**Meios de fermentação:** foram avaliados dois meios de fermentação M1 (Glicose/Óleo de Canola/Extrato de Levedura/Ureia – 100/100/10/1 g.L<sup>-1</sup>) e M2 (Glicose/Óleo de Canola – 100/100 g.L<sup>-1</sup>);

**Processo fermentativo:** os cultivos foram incubado por 120 h a 30 °C, em shaker orbital a 180 rpm

**Interrupção do cultivo e análises:** os cultivos foram interrompidos através da centrifugação 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 gramas por litro de SLP (SOLAIMAN et al, 2004). Todas as fermentações e análises foram realizadas em triplicatas.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de produção de SLP e biomassa estão demonstrados na tabela 1. Os ensaios 1 e 2 as células não se encontram imobilizadas e serviram como controle para o experimento. Pode-se observar que nos ensaios 1, 3, 5 e 7 (M1) as produções de SLPs são menores quando comparados aos ensaios 2, 4, 6 e 8 (M2) respectivamente e para a produção de biomassa esta relação é inversa (biomassa M1 > biomassa M2). Ou seja, a presença da fonte de Nitrogênio favorece o crescimento celular (RISPOLDI; BADIA; SHA, 2010), no caso da imobilização o crescimento celular não deve ocorrer pois pode ocorrer o rompimento ou desestruturação da rede formada de alginato de cálcio. Já nos ensaios com ausência de uma fonte de Nitrogênio (M2) observou-se as maiores produções de SLPs em detrimento da produção de biomassa. A maior produção de SLPs (célula imobilizada ensaios de 3 a 8) ocorreu nos ensaio nº 6 com inóculo de 5% e meio sem extrato de levedura.

**Tabela 1** – Variações do inóculo e meios de fermentação relacionados a produção de SLP.

Nº.	Ensaio	Biomassa inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa final (g/L <sup>-1</sup> )	Biomassa final / Biomassa inicial	pH final	SLP (g/L <sup>-1</sup> )
1	Inóculo controle Meio 1	0,8220	11,1427	13,5556	3,53	5,5840
2	Inóculo controle Meio 2	0,8220	2,0467	2,4899	2,81	4,4160
3	Inóculo 2,5% Meio 1	0,4112	1,7120	4,1634	3,78	1,6680
4	Inóculo 2,5% Meio 2	0,4112	0,6547	1,5921	3,07	3,7213
5	Inóculo 5% Meio 1	0,8225	2,2107	2,6877	3,82	1,9080
6	Inóculo 5% Meio 2	0,8225	0,9347	1,1364	2,90	4,7973
7	Inóculo 7,5% Meio 1	1,2337	1,7467	1,4158	3,76	1,3493
8	Inóculo 7,5% Meio 2	1,2337	0,4627	0,3750	2,75	3,7467

### CONCLUSÕES

A maior produção de SLP foi de 4,7943 g.L<sup>-1</sup> com inóculo de 5% utilizando meio sem fonte de nitrogênio. Posteriormente serão padronizados tamanho das esferas de alginato de sódio, temperatura, pH e aeração do processo fermentativo.

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

### REFERÊNCIAS

- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 79–101, 1996.
- 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.
- 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.



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- 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.
- 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.
- PAULO, E. M.; ASSIS, S. A.; SANTOS, V. L. C. S. Polímeros Constituídos Por Carboidratos Utilizados No Processo De Microencapsulação De Bactérias. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 9, n. 4, p. 185–191, 2003.
- RISPOLI, F.J.; BADIA, D.; SHAH, V. SHAH, Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design, *Biotechnology Progress*, vol. 26, no. 4, pp. 938–44, 2010.
- 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.
- 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.