

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Candida guilliermondii* UTILIZANDO SUCO DE CAJU COMO FONTE DE CARBONO

Andressa Lais Maria de Melo (1)*; Willyan Araújo da Costa (1); Renata Kelly Pereira da Silva (1)
Andréa Almeida de Farias (2); Sharline Florentino de Melo Santos (1)

¹Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química.

*andressa_jp@hotmail.com

²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia.

RESUMO: Os biossurfactantes são tensoativos produzidos via ação metabólica dos microrganismos e têm sido alvo de vários estudos na atualidade tendo em vista sua biodegradabilidade e boa estabilidade. O presente trabalho avaliou a produção de biossurfactantes pela *Candida guilliermondii* utilizando suco de caju como fonte de carbono objetivando a diminuição dos custos de produção. Os parâmetros da cinética de crescimento foram obtidos para um cultivo de 96 horas sob agitação de 200 rpm a 30 °C, obtendo uma velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$) de 0,1783 h⁻¹ e uma produtividade em biomassa (P_x) de 0,126 g.L⁻¹.h⁻¹. O melhor resultado de emulsificação foi para o óleo de motor, sendo o mesmo de 82,69%.

Palavras-Chave: Biossurfactantes, *Candida guilliermondii*, velocidade específica, índice de emulsificação.

1. INTRODUÇÃO

Os tensoativos são substâncias que possuem um caráter anfipático por apresentarem em sua estrutura molecular uma porção hidrofóbica, geralmente uma cadeia carbônica que pode ser linear, cíclica ou ramificada, e outra hidrofílica que é formada por algum átomo que apresente uma densidade de carga, negativa ou positiva, o que induz à formação de um momento de um polo (DALTON, 2012).

Tais moléculas são comumente mencionadas na literatura com o título de agentes surfactantes, pois as mesmas possuem como principal característica a capacidade de atenuar as tensões superficiais existentes entre interfaces fluidas. Sendo assim, a aplicabilidade de tais compostos é bastante ampla e se dá em diferentes setores da indústria, como: produção de alimentos, elaboração de fármacos, indústria petroquímica e outros.

A principal via de síntese dos compostos superficialmente ativos é a química. Porém, nos últimos anos, a rota biotecnológica tem sido apontada como sendo uma alternativa bastante promissora. Na síntese bioquímica, a formação dessas moléculas se dá pela ação do metabolismo de microrganismos e a denominação usualmente atribuída ao produto é a de biossurfactantes (ARAÚJO; FREIRE, 2013).

Os biossurfactantes possuem características específicas que os tornam bastante atrativos para a indústria, tais como: atividade superficial e interfacial, tolerância à temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidades e baixa toxicidade (NITSCHKE, 2002).

Mesmo em meio a tantas vantagens, a principal dificuldade associada à produção dos tensoativos de origem microbiana é o alto custo atrelado ao processo. Partindo disso, o emprego de fontes alternativas para baratear e aperfeiçoar o processo está sendo uma questão bastante levantada no meio científico. O emprego dos resíduos vem se mostrando uma das alternativas mais viáveis para tal empreitada, tendo em vista que o substrato corresponde a cerca de 50% dos custos totais do bioprocessamento (LUNA et al., 2015).

A diversidade de microrganismos capazes de sintetizar biossurfactantes é enorme e tem resultado em inúmeros trabalhos relacionados ao tema. As leveduras, em especial a do gênero *Candida*, já foram relatadas na literatura como produtoras de tais tensoativos biológicos (FONTES, AMARAL, COELHO, 2008; LUNA et al., 2015).

O objetivo dessa pesquisa foi realizar a avaliação do crescimento da *Candida Guilliermondii* através da obtenção dos parâmetros cinéticos e verificar a produção de biossurfactante por tal microrganismo.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a *Candida guilliermondii*. A cultura foi mantida em meio Yast Malt Agar (Y.M.A), composto por glicose 1% (m/V), extrato de levedura 0,3% (m/V), peptona 0,5% (m/V), extrato de malte 0,3% (m/V) e agar 2% (m/V), a 4°C.

O inóculo foi preparado colocando três alçadas da cepa em um erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL do meio de cultivo proposto por Santa Anna (2001), modificando apenas na fonte de carbono para o suco do caju. O meio foi constituído por KH_2PO_4 (3 g/L); K_2HPO_4 (7 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L); Suco de caju com 40g/L de açúcar redutores. A incubação foi realizada em mesa agitadora a 30°C e 200 rpm por 24h.

2.2. Produção de Biossurfactante

A produção de biossurfactantes foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 225 mL do mesmo meio usado para o inóculo. O meio de cultura foi esterilizado por 15 min, 1 atm e 111°C. Em seguida o meio foi inoculado com uma concentração de células de 10% (V/V). O crescimento da levedura foi verificado por 96 h em mesa rotatória a 200 rpm e temperatura 30°C. Foram retiradas amostras em diferentes intervalos de tempo para a análise do crescimento de células, consumo de substrato e, ao término, para a verificação do índice de emulsificação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.3. Análises

2.3.1. Crescimento Microbiano: Utilizou-se o método de turbidimetria, onde a concentração de biomassa foi mensurada através de uma curva de calibração que correlacionava a absorbância do meio, a um comprimento de onda de 600nm, com uma concentração celular em (g/L).

2.3.2. Açúcares Redutores: Para determinar a quantidade de açúcares redutores utilizou-se o método do 3,5- Dinitrossalicilato (DNS), proposto inicialmente por Miller (1959), adaptado por Vasconcelos(2013) da Embrapa Agroindústria Tropical.

2.3.3. Índice de Emulsificação: O índice de emulsificação foi obtido através da agitação em vórtex de 2,0 mL do meio de cultura, após as 96h de cultivo, com 2 mL de óleo de soja ou óleo de motor por 2 minutos. O índice de emulsificação corresponde à razão entre a altura da emulsão e a altura total da total de líquido. Como mostra a seguinte equação:

$$IE(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo H_{FE} a altura da fase emulsionada e H_{TOTAL} a altura total da solução.

2.4. Obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada segundo o proposto por SCHMIDELL et al. (2001).

2.4.1 Produtividade em biomassa: Expressa a velocidade média do crescimento microbiano, onde verifica-se a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo de cultivo. Onde X é a concentração final de células e X_0 é a concentração inicial.

$$P_x = (X - X_0) / (\text{tempo de cultivo}) \quad (2)$$

2.4.2 Velocidade específica de crescimento máxima: A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. A velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do $\ln(X)$ versus t (tempo de cultivo), na fase mencionada. A reta é dada pela seguinte relação linear:

$$\ln X = \mu(T - T_i) + \ln X_i \quad (3)$$

2.4.3 Tempo de Geração: O tempo de geração permite mensurar a que tempo a concentração de microrganismo irá dobrar do seu valor inicial. O mesmo é calculado por:

$$Tg = \ln(2) / \mu_{máx} \quad (4)$$

2.4.4 Fator de conversão de substrato em biomassa: É a relação estabelecida entre a quantidade de biomassa produzida e o teor de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um sob o outro. Dado pela expressão a seguir, onde S_0 é a concentração final de substrato e S a inicial.

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (5)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação do crescimento celular se deu por turbidimetria, onde uma curva de calibração foi obtida verificando-se, por peso seco, a quantidade de biomassa produzida pra o tempo de cultivo total, 96h e então diluindo-se essa concentração na seguinte ordem: 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60. As absorbâncias foram medidas a 600nm. Gerou-se então uma modelo linear que correlaciona a absorbância medida à uma concentração de células em g/L. Sendo o mesmo:

$$y = 1,7134x - 0,9784$$

(6)

Onde o valor da correlação linear do modelo foi $R^2=0,9795$, o que garante uma explicação de 97,84% das possíveis informações obtidas pelo mesmo.

Com os dados da produção de biomassa e de consumo de substrato obtidos ao longo da execução do bioprocessamento, montaram-se as curvas de crescimento celular e de decréscimo da concentração da fonte de carbono. Sendo as mesmas:

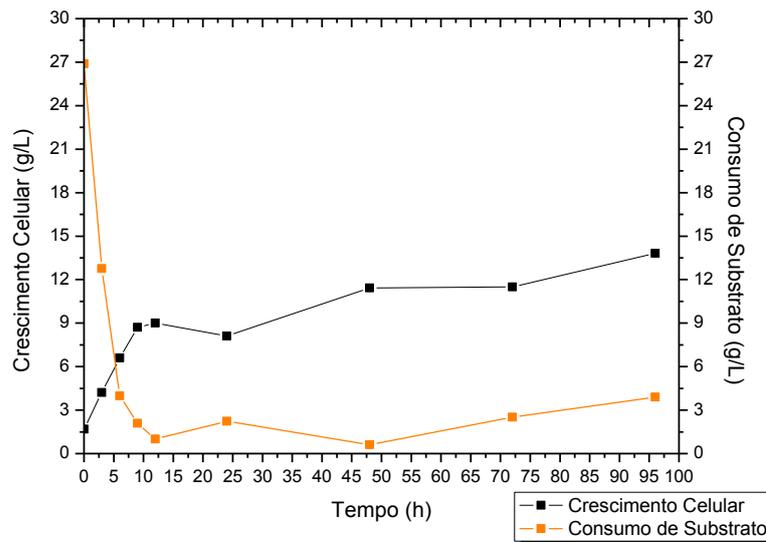


Figura 1 – Curva de crescimento celular e consumo de substrato para a *Candida guilliermondii* para o tempo de cultivo de 96h.

A curva mostra que o microrganismo teve rápida adaptação ao meio com o início da fase exponencial que foi de 0h às 9h de cultivo. Sendo assim, a determinação da velocidade específica de crescimento, tendo em vista que nessa fase ela é máxima e constante foi obtida pelo coeficiente linear da seguinte equação:

$$\ln(X) = 0,1783t + 0,7015 \quad (7)$$

Sendo assim $\mu_{m\acute{a}x}=0,1783 \text{ h}^{-1}$, o que fornece um tempo de geração (Tg) de 3,89 h. O modelo apresentou um valor de R^2 de 0,9332, o que assegura que há uma explicação de 93,32% das possíveis variações do mesmo frente aos valores reais.

A produtividade em biomassa (P_x) foi de $0,126 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foi de $0,528 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$.

Os resultados se aproximaram dos encontrados por Felipe et al. (2003), que estudou o cultivo da *Candida guilliermondii* objetivando a obtenção de bioprodutos. O meio de cultivo foi proveniente do enriquecimento de um hidrolisado hemicelulósico que possuía cerca de 32,33 g/L de Xilose (açúcar redutor limitante para o bioprocessamento estudado pelo autor). O meio foi suplementado com 2 g/L de sulfato de amônio, 20 g/L de farelo de arroz e 0,1 g/L de cloreto de cálcio dihidratado,

em condições de agitação e temperatura idênticas às do presente estudo, obtendo uma conversão de $0,54 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ e uma produtividade de $0,34 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

O índice de emulsificação é uma análise indireta da presença de biossurfactante, sua presença está relacionada com altos índices de emulsificação e estabilidade do emulsionado. A seguir, a Figura 2 mostrando percentualmente a capacidade de emulsionar em relação a dois óleos diferentes.

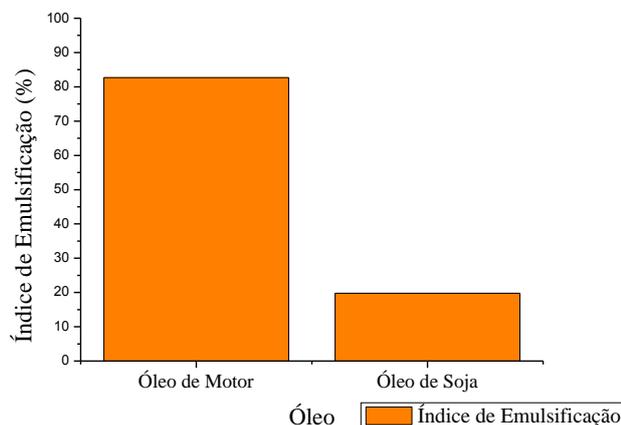


Figura 2 - Índice de emulsificação com diferentes óleos utilizando o meio livre de células com 96h de cultivo.

Para o óleo de soja o índice de emulsificação foi de 19,77%, enquanto que para o óleo de motor o mesmo chegou a 82,69%, mostrando que de fato foram produzidas substâncias com capacidade de alterar tensões interfaciais. Brasileiro (2013) obteve um percentual de emulsificação de 100% para o óleo de motor em um cultivo de 144 horas utilizando melaço (4%) e óleo de soja residual (2,5%) como fontes de carbono simultâneas. O melhor valor de índice obtido pelo autor se deve ao fato do mesmo ter utilizado um óleo no próprio meio de cultura, o mesmo atua como um indutor metabólico, fazendo com que o metabolismo microbiano produza mais substâncias tensoativas visando melhorar a disponibilidade dessa fonte de carbono no cultivo.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível avaliar a aplicabilidade da *Candida guilliermondii* em processos fermentativos objetivando a produção de biossurfactantes. Os parâmetros da cinética de crescimento microbiológico constataram que o emprego do suco do caju como fonte de carbono alternativa é viável, tendo em vista que se mostraram compatíveis com os obtidos em meios que empregavam outras fontes desse nutriente. Os índices de emulsificação obtidos constataram a presença de substâncias tensoativas, mostrando que o bioprocessamento estudado e desenvolvido atende ao que foi proposto.

6. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L. V. de.; FREIRE, D. M. G. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrogiana. *Química Nova*, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- BRASILEIRO, P. P. F. et al. Utilização de conservante para estabilização do biossurfactante produzido por *Candida guilliermondii* em biorreator. In: Congresso brasileiro de Engenharia Química, 20., 2014, Florianópolis, Anais de evento. São Paulo: Blucher proceedings, 2014.
- DALTIN, D. Tensoativos. In: Tensoativos: Química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher, 2011. P.11-35.
- FELIPE, M. G. et al. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xylitol por processo fermentativo. In: Simpósio nacional de fermentações, 14., 2003, Florianópolis. Anais de evento, Florianópolis, 2003. CDROM.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por leveduras. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
- LUNA, J. M. et al.; Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and surface A; physicochemical and engineering Aspects*, n. 480, p. 413-148, 2015.
- MILLER, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry* 1959 31 (3), 426-428 ,1959.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2006.
- SANTA ANNA, L. M, G. V. SEBASTIAN, N. PEREIRA, JR., T. L. M. ALVES, E. P. MENEZES, D. M. G. FREIRE. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001.
- SCHMIDELL, W.; LIMAS. U. A.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*, São Paulo, Blucher, v. 2, p.93-114, 2001
- VASONCELOS, N.M. D. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5- dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.