

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Ensaio para produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais

Pedro Henrique Machado Rodrigues

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Ensaio para produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais

Pedro Henrique Machado Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Ensaio para produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais

Pedro Henrique Machado Rodrigues

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos  
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do curso de  
Biotecnologia em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Ensaio para produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais

Pedro Henrique Machado Rodrigues

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nota: \_\_\_\_\_

---

Edgar Silveira Campos

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

*Dedico esse trabalho a minha família*

## **Agradecimentos**

Agradeço principalmente a minha mãe, Alessandra, a minha vó, Nair, e ao meu pai, Ragson, que lutaram e deram suporte para que eu chegasse até aqui. Sem eles nada disso seria possível.

Agradeço também ao Prof. Dr. Edgar Silveira Campos, que me adotou como orientando e mostrou os caminhos da investigação científica com paciência, humildade e sempre disposto e disponível para me ajudar quando necessário, não poderia ter escolhido um orientador melhor.

Quero agradecer imensamente ao Prof. Dr. José António Teixeira que permitiu que eu pesquisasse em seu laboratório de fermentações na Universidade do Minho durante minha estada em Braga, Portugal. Anseio salutar minha profunda gratidão e respeito ao diretor assistente do laboratório de fermentação Dr. Eduardo Gudiña, que foi meu orientador no laboratório, agindo como um “pai”, me dando conselhos, críticas, ajudando no meu crescimento profissional e pessoal.

A banca examinadora por aceitarem o convite e comparecer a defesa. Aos meus amigos que fiz graças a UFU, Asaph Diniz, Camila Verardo, Clésio Junior, Jéssica Pereira, Géssyca Ferreira, João Vítor Pereira, Leticia Guerra e Rafael Martins (Catalão) pelos momentos de distração, lazer, companheirismo e apoio. Aos meus amigos de intercâmbio Anna Luiza Wan Der Maas, Barbara Scarlet, Daryanne Santos, Diogo Heilbuth (Mineirin), Flávia Gallego, José Lucas Miranda, João Granja, Mariana Becker, Pedro Mello, Rodrigo Hinokuma, Rodrigo Pries (Wizard) e Thais Lhrer, que neste último ano se mostraram não só como colegas de uma experiência, mas sim irmãos de risadas, viagens, companheirismo e que vou levar comigo para toda vida, apesar da distância.

## RESUMO

A *Starmerella bombicola* é uma levedura não patogênica produtora do biossurfactante soforolipídio. O soforolipídio é classificado como um composto promissor e oferece várias vantagens em relação aos surfactantes químicos, dentre eles, a atividade específica que se mantém com a variação de temperatura, baixa toxicidade, biodegradabilidade e que pode ser produzido em grandes quantidades. Entretanto, os custos para sua produção são altos, por isso, o presente estudo utilizou resíduos industriais como o melaço de cana-de-açúcar e o “corn steep liquor” (CSL) para produção de biossurfactante e utilização de diferentes tipos de óleos vegetais e resíduo da extração do óleo de oliva (OMW) para auxiliar no processo fermentativo ao reduzir os custos da matéria prima. Os resultados mostraram que as matérias primas analisadas podem ser utilizadas como substitutos da glicose e extrato de levedura, visto que, houve redução da tensão superficial e bom crescimento celular tanto em biorreator e em Erlenmeyer. Além disso, o óleo de soja também pode ser utilizado como substância auxiliadora na produção do soforolipídio.

**Palavras-chave:** *Starmerella bombicola*; biossurfactante; óleo vegetal; resíduos industriais; tensão superficial; densidade ótica.

## SUMÁRIO

|               |                                                                    |           |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>     | <b>Introdução .....</b>                                            | <b>1</b>  |
| <b>1.1.</b>   | <b>Biossurfactantes .....</b>                                      | <b>2</b>  |
| <b>1.2.</b>   | <b>Produção de biossurfactante por microrganismos .....</b>        | <b>3</b>  |
| <b>1.3.</b>   | <b>Fatores que interferem na produção do biossurfactante .....</b> | <b>5</b>  |
| <b>1.3.1.</b> | <b>Fontes de carbono .....</b>                                     | <b>5</b>  |
| <b>1.3.2.</b> | <b>Fontes de nitrogênio .....</b>                                  | <b>5</b>  |
| <b>1.3.3.</b> | <b>Fatores ambientais .....</b>                                    | <b>6</b>  |
| <b>1.4.</b>   | <b>Classificação dos biossurfactantes .....</b>                    | <b>7</b>  |
| <b>1.4.1.</b> | <b>Glicolipídios .....</b>                                         | <b>7</b>  |
| <b>1.4.2.</b> | <b>Lipopeptídios e lipoproteínas .....</b>                         | <b>8</b>  |
| <b>1.4.3.</b> | <b>Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros .....</b>       | <b>8</b>  |
| <b>1.4.4.</b> | <b>Biossurfactantes poliméricos .....</b>                          | <b>9</b>  |
| <b>1.4.5.</b> | <b>Biossurfactantes particulados .....</b>                         | <b>9</b>  |
| <b>1.5.</b>   | <b>Aplicações dos biossurfactantes .....</b>                       | <b>10</b> |
| <b>1.5.1.</b> | <b>Biorremediação .....</b>                                        | <b>10</b> |
| <b>1.5.2.</b> | <b>Aplicação do biossurfactante na indústria petroleira .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.5.3.</b> | <b>Indústria de alimentos .....</b>                                | <b>12</b> |
| <b>1.5.4.</b> | <b>Área médica .....</b>                                           | <b>13</b> |
| <b>1.5.5.</b> | <b>Detergentes comerciais para lavanderia .....</b>                | <b>13</b> |



|        |                                      |    |
|--------|--------------------------------------|----|
| 1.6.   | <i>Starmerella bombicola</i> .....   | 14 |
| 1.6.1. | Biossíntese de soforolipídio .....   | 15 |
| 2.     | Objetivos.....                       | 17 |
| 2.1.   | Objetivo geral .....                 | 17 |
| 2.2.   | Objetivos específicos.....           | 17 |
| 3.     | Materiais e métodos.....             | 17 |
| 3.1.   | Microrganismo e sua manutenção ..... | 17 |
| 3.2.   | Produtos químicos e reagentes.....   | 17 |
| 3.3.   | Preparo do pré-inóculo .....         | 18 |
| 3.4.   | Preparo dos meios de cultura.....    | 18 |
| 3.5.   | Biorreator .....                     | 20 |
| 3.6.   | Análise da tensão superficial.....   | 20 |
| 3.7.   | Análise do crescimento celular.....  | 21 |
| 3.8.   | Extração do biossurfactante .....    | 21 |
| 4.     | Resultados.....                      | 22 |
| 5.     | Discussão.....                       | 30 |
| 6.     | Conclusão.....                       | 36 |
|        | Referências bibliográficas.....      | 37 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Obtenção da concentração micelar crítica (CMC). Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2016, p. 2. .... 3
- Figura 3.** Estrutura química dos glicolipídios. **A)** Ramnolipídio; **B)** Trealolipídio e **C)** Soforolipídio. Fonte: Google imagens. .... 7
- Figura 4.** Estrutura da lipoproteína cíclica surfactina produzida por *Bacillus subtilis*. Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50. .... 8
- Figura 5.** Estrutura da fosfatidiletanolamina, produzida por *Acinetobacter* spp. R1 e R2 são cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos. Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50. .... 8
- Figura 6.** Estrutura química do Emulsan (A) e do Liposan (B). Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50. e Google Imagem. .... 9
- Figura 2.** Mecanismo metabólico de biossíntese de soforolipídios pela *S. bombicola* Fonte: Adaptado de CIESIELSKA et al., (2013), pag. B. .... 16
- Figura 7.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas em frascos com OMW, óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + óleo de oliva, ambos a 100 g/L, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 horas. .... 22
- Figura 8.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas em frascos com 50, 100, 150 e 200 g/L de melaço, 100 g/L de óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 168 h. .... 23
- Figura 9.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| em frascos com 5, 10, 15 e 20 mL de CSL, 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 h.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 10.</b> (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com <i>Starmerella bombicola</i> cultivadas em frascos com 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 h.....                                                     | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Valores de tensão superficial analisados nas diluições de 1:10 dos meios com 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas. ....                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| <b>Figura 12.</b> Avaliação do crescimento celular (DO) e tensão superficial (mN/m), sem e com diluição de 1:20, 1:50 e 1:100, em fermentação realizada durante 168 horas com <i>Starmerella bombicola</i> em biorreator com 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C, 400 rpm sem controle de pH e aeração em 2 L/min. ....                           | 27 |
| <b>Figura 13.</b> Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m), consumo de oxigênio {PO <sub>2</sub> (%)}, densidade ótica (DO) e comportamento do pH, em fermentação realizada durante 168 horas com <i>Starmerella bombicola</i> em biorreator com 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C, 400 rpm sem controle de pH e aeração em 2 L/min. . | 28 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Variação da composição de cada meio de cultura (a, b, c, d) em Erlenmeyer de acordo com cada imização realizada. ....                         | 19 |
| <b>Tabela 2.</b> Resultado das tensões superficiais após diluições de 1:5 e 1:10 das amostras dos meios de 5, 10, 15, 20 mL de CSL no tempo de 144 horas. .... | 25 |
| <b>Tabela 3.</b> Concentração de sofrolipídios extraídos nas otimizações realizadas após processo de liofilização. ....                                        | 29 |

## TABELA DE ABREVIATURAS

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Sulfato de amônio

**AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida

**CMC** - Concentração micelar crítica

**CSL** – “Corn steep liquor”

**CYP52** - Citocromo monoxigenase P450

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DO** – Densidade ótica

**GRAS** - “Generally regarded as safe”

**H<sup>+</sup>** - Íon Hidrogênio

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana

**K<sup>+</sup>** - Íon Potássio

**MEOR** - “Microbial Enhanced Oil Recovery”

**NADPH** - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina

**OMW** – “Olive mill wastewater”

**UDP** - Uridina difosfato glicose

## 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes apresentam uma estrutura molecular de caráter anfipático, ou seja, apresentam uma porção apolar e uma outra polar, sendo capazes de promover a emulsificação de hidrocarbonetos, tornando-os solúveis em água, além de reduzir a tensão superficial e elevar o deslocamento de compostos oleosos. Eles podem ser biologicamente produzidos por leveduras, bactérias e fungos, sendo chamados de biossurfactantes. Além disso, Possuem diversas aplicações como produtos de limpeza ambiental, usados na recuperação de petróleo, fármacos, alimentos e cosméticos (BANAT, 1995).

Os biossurfactantes possuem vantagens sobre seus químicos homólogos, pois eles são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade, são efetivos em temperaturas extremas ou variações de pH, apresentam menor concentração micelar crítica (CMC), diversidade estrutural, baixa capacidade de formação de espuma e uma alta detergência, melhor compatibilidade ambiental (DANIEL; REUSS; SYLDATK, 1998; HIRATA *et al.*, 2009; RUFINO *et al.*, 2014).

A produção total de surfactantes em 2012 foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, sendo que destes, 3,5 milhões de toneladas foram de biossurfactantes. Além disso, as receitas da parte de base biológica do mercado foram de U\$ 6,588 milhões. No entanto, do ponto de vista econômico, biossurfactantes apresentam um custo de produção maior do que o seu equivalente químico, impedindo a imediata troca entre os compostos (CAMPOS *et al.*, 2013).

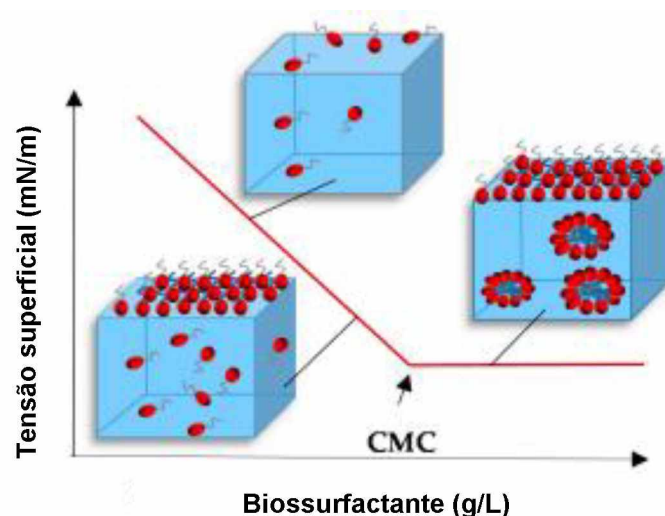
Ainda é importante destacar que os biossurfactantes podem ser produzidos com recursos renováveis e econômicos, tais como: óleos vegetais, resíduos de destilaria e resíduos de laticínios. Desta forma, torna-se relevante o desenvolvimento de novas metodologias e exploração de diferentes matérias primas que possam viabilizar a produção de biossurfactantes de modo que haja uma melhor e maior competição com o mercado de surfactantes químicos (RUFINO *et al.*, 2014).

No que tange aos microrganismos que são capazes de sintetizar biossurfactantes, os produzidos por bactérias, que são os mais estudados, possuem limitações de uso em algumas áreas devido a sua patogenicidade. Neste contexto, algumas leveduras que possuem o *status* de “generally regarded as safe” (GRAS) e portanto não patogênicos tem sido investigados como potenciais produtores de biossurfactantes (SHEPHERD *et al.*, 1995).

### **1.1. Biossurfactantes**

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica que dividem, preferencialmente, interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como óleo/água ou ar/água. O fragmento apolar geralmente é composto por hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfótera (SILVA *et al.*, 2014).

Uma das características dos biossurfactantes é seu baixo valor de CMC. A CMC consiste na concentração de biossurfactantes em que conjuntos moleculares organizados, conhecidos como micelas, são formados e correspondem ao ponto em que o biossurfactante atinge a menor tensão superficial estável, após o qual os compostos adicionais não têm mais efeito (Figura 1). A CMC é a medida mais utilizada para a avaliação da atividade surfactante e também pode ser definida como a solubilidade de um surfactante na fase aquosa (CAMPOS *et al.*, 2013; RUFINO *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Obtenção da concentração micelar crítica (CMC). Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.*, 2016, p. 2.

## 1.2. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR MICRORGANISMOS

Há uma grande variedade de microrganismos que são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (DELEU; PAQUOT, 2004). A composição e rendimento da síntese deste produto dependem do tipo de fermentador utilizado, pH, nutrientes, substratos e temperaturas empregados (MULLIGAN, 2005).

Os microrganismos usam um conjunto de nutrientes para o seu crescimento como fontes de carbono, açúcares, fontes de nitrogênio e alguns elementos traço e, como consequência, ocorre a produção do biossurfactante. A combinação de fontes de carbono hidrofílica com substratos insolúveis facilita a difusão intracelular e a produção de diferentes substâncias (DAS, 2014). Ainda, os microrganismos produzem os biossurfactantes durante seu crescimento em substratos hidrofóbicos, e na maioria das vezes tal evento ocorre na fase estacionária do crescimento celular (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

A cinética de produção dos biossurfactantes exhibe variações entre os diferentes sistemas, podendo levar a algumas generalizações. Outrora, por conveniência, os parâmetros cinéticos podem ser agrupados nos seguintes tipos: produção associada ao crescimento, produção sob condições limitantes de crescimento, produção de células em repouso ou imobilizadas e



produção com a suplementação de um precursor. Para a produção associada ao crescimento, existe uma relação paralela entre o crescimento, utilização de substrato e produção do biossurfactante, em que o biossurfactante aumentará sua produção concomitantemente ao crescimento do microrganismo e diminuição do substrato (DESAI; BANAT, 1997).

Na produção sob condições limitantes de crescimento, há aumento acentuado no nível de biossurfactante devido à limitação de um ou mais componentes do meio de cultura (DESAI; BANAT, 1997). Portanto, a formação do produto se dá após o início do crescimento celular, quando a presença de um item do meio se limita. Sabe-se, ainda, que uma maior produção de biossurfactante ocorre quando o crescimento está na fase estacionária, em que há uma limitação de nitrogênio e ferro (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1984).

A produção de biossurfactante por células em repouso ou imobilizadas ocorre quando não há multiplicação das células, permanecendo na fase estacionária. No entanto, a célula continua a utilizar as fontes de carbono para a síntese do biossurfactante. A produção de biossurfactante por esse parâmetro é importante para a redução do custo de recuperação do produto, pois as fases de crescimento e formação do produto podem ser separadas (DESAI; BANAT, 1997).

Por último, a produção com a suplementação de um precursor ocorre quando adicionam-se precursores de biossurfactantes no meio de cultura, causando mudanças na produção tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Por exemplo, a adição de compostos lipofílicos ao meio de cultura de *Starmarella bombicola* resultou no aumento da produção de biossurfactante com rendimentos de cerca de 120 a 150 g/L (LEE; KIM, 1993).

O motivo pelo qual os microrganismos produzem os biossurfactantes ainda não é totalmente esclarecido. Sugere-se que a produção ocorra para sobrevivência em ambientes com substratos hidrofóbico e dessorção desses, permitindo contato direto com a célula, o que

aumenta a biodisponibilidade dos substratos insolúveis (MARGESIN; SCHINNER, 2001; OLIVERA *et al.*, 2003).

A síntese deste produto pode ocorrer por uma via *de novo* e/ou pela montagem a partir do substrato. De acordo com que Sen (2010), a proposta para a síntese do biossurfactante apresenta quatro pressupostos: (1) tanto a porção apolar e polar são sintetizados em vias *de novo* independentemente; (2) a parte hidrofílica é sintetizada por uma via *de novo* e a porção hidrofóbica induzida pelo substrato; (3) a parte hidrofóbica é induzida pela via *de novo* e a hidrofílica sintetizada a partir do substrato e (4) ambas as porções hidrofóbica e hidrofílica são sintetizados utilizando o substrato.

### **1.3. FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE**

#### **1.3.1. Fontes de carbono**

As fontes de carbono possuem papel fundamental no crescimento e produção de biossurfactantes por microrganismos, variando de espécie para espécie (SANTOS *et al.*, 2016). Finnerty e Singer (1985) e Neidleman e Geigert (1984) mostraram evidências de variação qualitativa, refletindo o número de alcanos na produção de biossurfactante em *Acinetobacter sp.* estirpes H13-A e H01-N, respectivamente. Um rendimento muito baixo foi encontrado quando apenas glicose ou óleo vegetal foi usado para a produção de um biossurfactante por *Torulopsis bombicola*, mas o rendimento aumentou para 70 g/L quando ambas as fontes de carbono foram fornecidas juntas (COOPER; PADDOCK, 1984).

#### **1.3.2. Fontes de nitrogênio**

As fontes de nitrogênio consistem no segundo suplemento mais importante para a produção de biossurfactantes por microrganismos. Nos processos fermentativos, a relação C/N afeta o acúmulo de metabólitos. Quanto maior a relação C/N (isto é, baixos níveis de nitrogênio) mais limitado é o crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo celular para a produção de metabólitos. Em contraste, o excesso de nitrogênio leva à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos (ROBERT *et al.*, 1989).

Diferentes fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico têm sido utilizadas na produção de biossurfactantes. Esse composto apresenta uma grande importância para a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa*, bactéria gram negativa produtora do biossurfactante ramnolípido, cultivada em meio mineral contendo 3% de glicerol. Como o nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) se mostrou mais eficaz que o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), as limitações nutricionais orientam claramente o metabolismo celular para a formação do produto (SANTA ANNA *et al.*, 2001).

### 1.3.3. Fatores ambientais

Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes através de seus efeitos sobre o crescimento ou atividade celular (DESAI; BANAT, 1997). Nos microrganismos o pH do meio desempenha um papel importante na produção de soforolípídios, pois o seu valor pode favorecer a maior captação de glicose como fonte de carbono para a produção do biossurfactante (SOUZA *et al.*, 2017a).

O segundo fator é a temperatura que altera a composição do biossurfactante produzido por microrganismo (DROUIN; COOPER, 1992). Outro fator que altera a produção de biossurfactante são os sais, pois dependendo de suas concentrações pode ocorrer a alteração da atividade celular do microrganismo, alterando a sua produção. Alguns biossurfactantes, no entanto, não são afetados por concentrações salinas de até 10% (massa/volume) (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991).

Ainda, a transferência de oxigênio é outro parâmetro importante para a otimização do processo e aumento de escala da produção de biossurfactante, pois o oxigênio pode ser um cofator importante na via de biossíntese do surfactante biológico (SHEPPARD; COOPER, 1990). Em levedura, a produção de biossurfactante aumenta quando as taxas de agitação e aeração são aumentadas (SPENCER; SPENCER; TULLOCH, 1979).

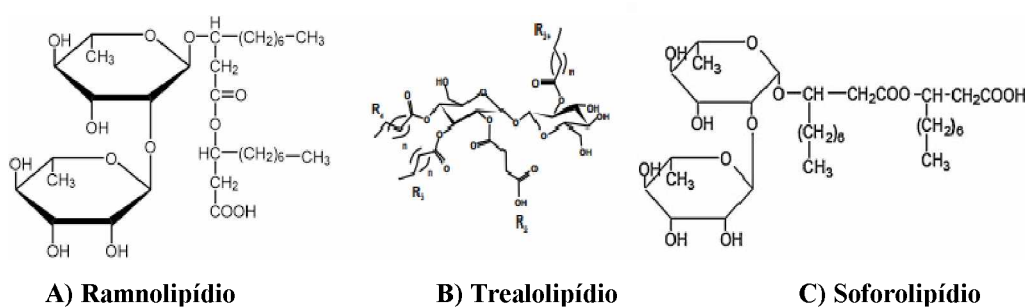
## 1.4. CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e os microrganismos que os produzem. Portanto, os biossurfactantes são divididos em glicolípidos, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolípidos, ácidos graxos hidroxilados e de ligação cruzada e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e particulados ( LANG; WAGNER, 1987).

### 1.4.1. Glicolípidios

Os glicolípidos (Figura 3) são os biossurfactantes mais conhecidos entre as classes existentes. Eles são constituídos por carboidratos em combinação com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos. Entre os glicolípidios, os mais conhecidos são ramnolípideos, trealolípideos e soforolípideos (DESAI; BANAT, 1997).

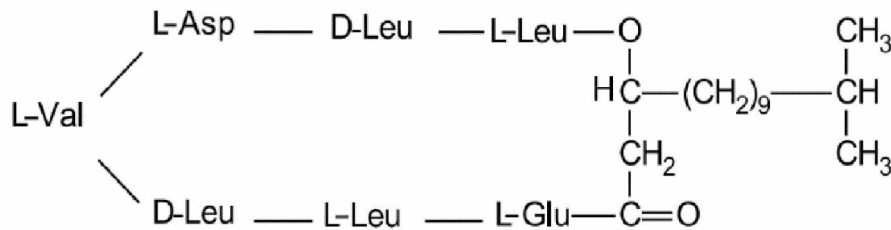
Os ramnolípideos são formados por uma ou duas moléculas de ramnose que estão ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. Os soforolípideos por sua vez apresentam um carboidrato dimérico de soforose ligado a um ácido graxo hidroxil de cadeia longa através de uma ligação glicosídica. O trealolípideo é o dissacarídeo trealose ligada em um carbono 6 e 6' aos ácidos micólicos, sendo estes, ácidos graxos de cadeia longa (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; DESAI; BANAT, 1997; HU; JU, 2001).



**Figura 2.** Estrutura química dos glicolípidios. **A)** Ramnolípídio; **B)** Trealolípídio e **C)** Soforolípídio. Fonte: Google imagens.

### 1.4.2. Lipopeptídios e lipoproteínas

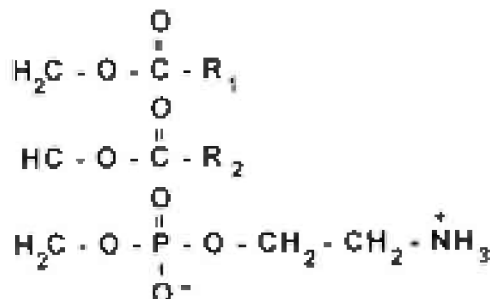
Os lipopeptídios são produzidos, por exemplo, por bactérias do gênero *Bacillus* e apresentam alta eficiência como tensoativos (FIECHTER, 1992). O lipopeptídeo cíclico surfactina (Figura 4) é produzida por linhagens de *B. subtilis*, classificado como um dos mais potentes biossurfactantes, pois consegue diminuir a tensão superficial de 72 para 27,9 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968).



**Figura 3.** Estrutura da lipoproteína cíclica surfactina produzida por *Bacillus subtilis*. Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50.

### 1.4.3. Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros

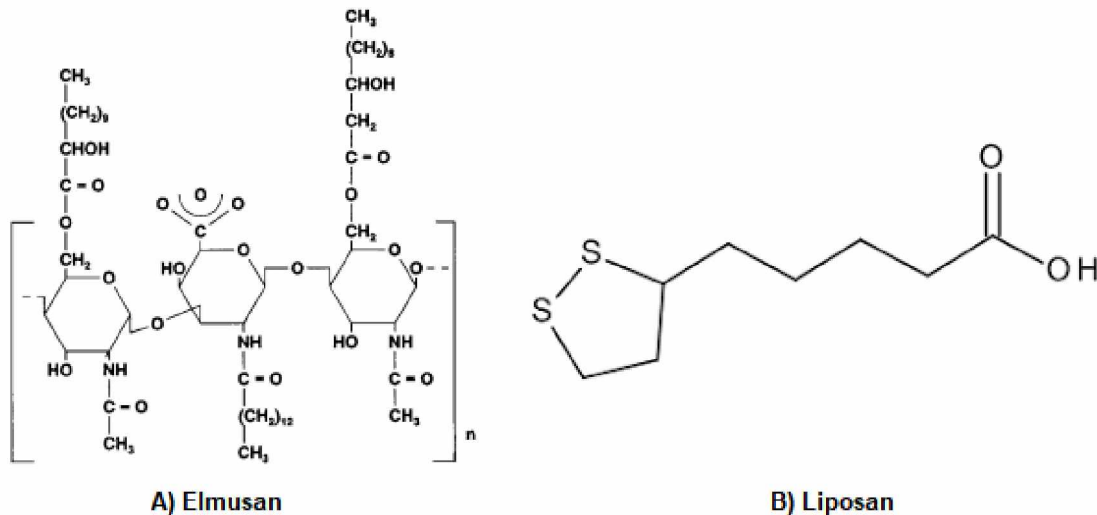
Diferentes bactérias e leveduras produzem grandes quantidades de ácidos graxos e surfactantes fosfolipídicos durante o crescimento em alcanos. Vesículas ricas em fosfatidiletanolamina (figura 5) são produzidas a partir de *Acinetobacter spp.* e formam microemulsões opticamente claras de alcanos em água. Esses biossurfactantes são essenciais para aplicações médicas (GAUTAM; TYAGI, 2006).



**Figura 4.** Estrutura da fosfatidiletanolamina, produzida por *Acinetobacter spp.* R1 e R2 são cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos. Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50.

#### 1.4.4. Biossurfactantes poliméricos

Emulsan, lipomanan, alasan, liposan e outros complexos de proteínas polissacarídicos são os biossurfactantes poliméricos mais bem estudados. O Emulsan (figura 6) é um emulsificante para hidrocarbonetos em água em concentrações tão baixas quanto 0,001% à 0,01% (HATHA; EDWARD; PATTANATHU RAHMAN, 2007; LANG, 2002). Liposan (figura 6) é um emulsificante solúvel em água extracelular sintetizado por *C. lipolytica* e é constituído por 83% de carboidratos e 17% de proteínas. Há uma discussão para estudar a aplicação do Liposan como emulsionante nas indústrias de alimentos e cosméticos (CHAKRABARTI, 2012).



**Figura 5.** Estrutura química do Emulsan (A) e do Liposan (B). Fonte: DESAI e BANAT, 1997, p. 50. e Google Imagem.

#### 1.4.5. Biossurfactantes particulados

Os biossurfactantes particulados são caracterizados por dividir as vesículas de membrana extracelular para formar uma microemulsão que exerce influência na captura de alcanos nas células microbianas. O *Acinetobacter spp.* possui vesículas com diâmetro de 20 a 50 nm e densidade de 1,158 g/cm<sup>3</sup> composto por proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (CHAKRABARTI, 2012; VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015).

## 1.5. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes estão se tornando cada vez mais importantes produtos da área biotecnológica para aplicações industriais e médicas devido a seus modos específicos de ação, baixa toxicidade, relativa facilidade de preparação e ampla aplicabilidade. Eles podem ser usados como emulsificantes, desemulsificantes, para degradação de contaminantes químicos, agentes umectantes e espumantes, ingredientes alimentares funcionais e como detergentes em petróleo, petroquímica, gestão ambiental, agroquímicos, alimentos e bebidas, cosméticos e produtos farmacêuticos, detergentes de lavanderia comerciais e nas indústrias de mineração e metalurgia (SANTOS *et al.*, 2016).

### 1.5.1. Biorremediação

A biorremediação é hoje considerada uma das alternativas mais promissoras da biotecnologia ambiental. Essa tecnologia usa a incrível capacidade de microrganismos ou plantas de acumular, desintoxicar, degradar ou remover contaminantes ambientais. A biorremediação proporciona a transformação e/ou até a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos, mesmo quando presentes em baixa concentração (HLIHOR *et al.*, 2017).

A contaminação do solo por óleo é um problema comum e os métodos de tratamento físico ou técnicas de remediação existentes podem ser difíceis ou economicamente inviáveis. Desta forma, o processo de biorremediação *in situ* pelo uso de microrganismos surge como um potencial método para solucionar esse tipo de contaminação (DAS; MUKHERJEE, 2007).

O uso de surfactantes químicos na biorremediação pode melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, permitindo a dessorção e solubilização de compostos hidrofóbicos e metais pesados e facilitando a assimilação desses compostos por células microbianas. Entretanto os surfactantes químicos alteram a permeabilidade da membrana celular microbiana, o que compromete a capacidade de biodegradação por microrganismos (HUNT; ROBINSON; GHOSH, 1994). Por essa razão os biossurfactantes estão sendo usados cada vez mais já que, geralmente, são bem menos tóxicos que os surfactantes químicos, mas são tão eficazes e mais

facilmente biodegradáveis. Além disso, o uso de microrganismos capazes de produzir seus próprios biossurfactantes através da degradação de poluentes pode reduzir ainda mais os custos do tratamento.

### **1.5.2. Aplicação do Biossurfactante na Indústria Petroleira**

Devido às excelentes propriedades emulsificantes dos biossurfactantes eles são usados como detergentes na limpeza de bancos de armazenamento de hidrocarbonetos/petróleo bruto. Quando produzidos por uma cepa bacteriana (Pet 1006), mostraram-se capazes de limpar tanques de armazenamento de óleo e recuperar hidrocarbonetos de lodo emulsionado (BANAT *et al.*, 1991). Em um teste para a limpeza de tanques de armazenamento de óleo, cerca de 91% do petróleo bruto pôde ser recuperado do lodo total. Esse processo de limpeza é altamente desejável, visto que se torna economicamente viável e ecologicamente correto (LILLIENBERG *et al.*, 1992).

A baixa permeabilidade ou a alta viscosidade do óleo, bem como as altas tensões interfaciais entre a água e o óleo podem resultar em forças capilares altas retendo o óleo na rocha do reservatório levando a uma recuperação pobre do óleo (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991). Devido ao fracasso das técnicas de recuperação para reintegração do óleo dos reservatórios, os interesses evoluíram em técnicas de recuperação terciária, cujo objetivo está na retomada avançada de óleo “Microbial Enhanced Oil Recovery” (MEOR) utilizando microrganismos e/ou seu biossurfactante, o qual aproximadamente 30% do óleo presente em um reservatório pode ser recuperado (FINNERTY ;SINGER, 1984; MUKHERJEE, 2007).

Existem várias estratégias envolvendo o uso de biossurfactante no MEOR. A primeira estratégia envolve a inserção de microrganismos produtores de biossurfactantes em um reservatório através do poço, com subsequente propagação *in situ* de micróbios através da rocha do reservatório. A segunda estratégia envolve a adição de nutrientes selecionados em um



reservatório, afim de favorecer e encorajar o crescimento de microrganismos produtores de biossurfactantes indígenas, ou seja, produzidos por microrganismos nativos do ambiente contaminado. O terceiro mecanismo envolve a produção de biossurfactantes em biorreatores *ex situ* e posterior introdução no reservatório. Um exemplo dessa aplicação consiste no caldo de cultura contendo biossurfactante de *Rhodococcus* ST-581 e o termofílico *Bacillus* AB-282 pode liberar 80% e 95% de óleo de colunas de areia, respectivamente ( BUBELA, 1987; ABURUWAIDA *et al.*, 1991).

### **1.5.3. Indústria de alimentos**

Os biossurfactantes possuem várias aplicações na indústria de alimentos, como a capacidade de controlar a aglomeração de glóbulos de gordura, estabilizar sistemas aerados, melhorar a textura e o prazo de validade de produtos contendo amido, modificar propriedades reológicas da massa de trigo e melhorar a consistência e textura de produtos à base de gordura (NITSCHKE; COSTA, 2007; KACHHOLZ; SCHLINGMANN, 1987).

A emulsificação é um processo importante na indústria de alimentos, sendo essenciais na formação da consistência e textura em alimentos, bem como a dispersão de fases e solubilização de aromas. A função principal dos emulsificantes em produtos alimentícios é estabilizar a emulsão, controlando a aglomeração dos glóbulos de gordura e estabilizando os sistemas aerados. Uma emulsão tem pelo menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) na forma de gotículas. A estabilidade deste sistema é mínima, mas pode ser aumentada pela adição de um surfactante, que reduz a energia superficial entre as duas fases por uma redução na tensão interfacial, impedindo assim a coalescência de partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas (CAMPOS *et al.*, 2013; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Recentemente, um bioemulsificante isolado de uma cepa marinha de *Enterobacter cloacae* foi usado como um potencial agente para o aumento da viscosidade de interesse na

indústria de alimentos, especialmente devido à boa viscosidade observada em pH ácido permitindo seu uso em produtos alimentícios contendo ácidos comestíveis, como ácido cítrico ou ácido ascórbico (IYER; MODY; JHA, 2006).

#### **1.5.4. Área médica**

Os biossurfactantes também têm sido utilizados em diferentes aplicações biológicas devido às suas propriedades fungicidas, bactericidas, inseticidas e antivirais, bem como utilizados como agentes antiadesivos e inibidores de enzimas (RANGARAJAN; SEN, 2013; WEST; HARWELL, 1992). Abalos *et al.*, (2001), identificaram seis ramminolipídeos em culturas de *P. aeruginosa* AT10 cultivadas em resíduo de refinaria de óleo de soja e avaliaram as propriedades antimicrobianas da solução, mostrando que os ramnolipídeos apresentam atividade antibacteriana.

A surfactina possui propriedades como a hemólise e inibe a formação de coágulos de fibrina, o que indica seu uso potencial no setor farmacêutico (RODRIGUES *et al.*, 2006). A iturina, produzida por *B. subtilis*, exibe propriedades antifúngicas (THIMON *et al.*, 1995). Os soforolipídios produzidos pela *S. bombicola* têm sido estudados devido às suas atividades espermicidas e citotóxicas, bem como à ação antiHIV que pode reduzir a proliferação da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), assim como, também foram estudados como agentes anti-inflamatórios para pacientes com doenças imunológicas (KITAMOTO *et al.*, 2009; MUTHUSAMY *et al.*, 2008). Apesar do grande número de publicações e patentes relacionadas ao uso de biossurfactante, aplicações reais nas indústrias farmacêutica, biomédica e de saúde permanecem bastante limitadas (FRACCHIA *et al.*, 2015).

#### **1.5.5. Detergentes comerciais para lavanderia**

A maioria dos compostos tensoativos (elementos importantes utilizados nos detergentes de lavanderia comerciais modernos) são quimicamente sintetizados e apresentam toxicidade para organismos vivos de água doce. Portanto, a crescente inquietação pública sobre os riscos

ambientais associados aos surfactantes químicos estimulou a busca por substitutos naturais e ecológicos dos tensoativos químicos em detergentes para lavanderia (SEN, 2010).

Os biosurfactantes lipopeptídicos cíclicos mostraram boa capacidade de formação de emulsão com óleos vegetais e excelente compatibilidade e estabilidade com detergentes comerciais para lavanderia, favorecendo sua inclusão em formulações para esses tipos de produtos (MUKHERJEE, 2007).

#### **1.6. *Starmerella bombicola***

A *Starmerella bombicola* é uma levedura que foi retratada primeiramente por Spencer, Gorin e Tulloch (1970), a que identificaram em várias amostras de néctar de plantas selvagens oriundas de diferentes partes do Canadá, sendo relacionada inicialmente ao gênero *Torulopsis* após a realização de ensaios bioquímicos. A *Torulopsis bombicola* tem a sua ocorrência frequente e sua estreita associação com as abelhas, onde está envolvida com relações de mutualismo com o inseto (SPENCER; GORIN; TULLOCH, 1970).

No ano de 1998, um estudo de análise filogenética foi realizado por Rosa e Lachance (1998) que propuseram a troca do gênero para *Starmerella*, para acondicionar o estado teleomórfico (estágio sexual) da então *Candida* (sinônimo de *Torulopsis*) *bombicola*. O nome *Starmerella*, então, foi dado em homenagem a Willian S. Starmer, em reconhecimento a sua contribuição para ecologia e evolução de leveduras associadas a plantas e insetos (ROSA; LACHANCE, 1998).

As leveduras são comumente conhecidas como produtoras de soforolipídios. O biosurfactante é um composto promissor que oferece várias vantagens em relação aos surfactantes químicos: elevada seletividade e atividade específica em uma ampla gama de condições de temperatura, pH e salinidade, baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e aceitação ecológica e eles podem ser produzidos em grandes quantidades (RUFINO *et al.*, 2014).

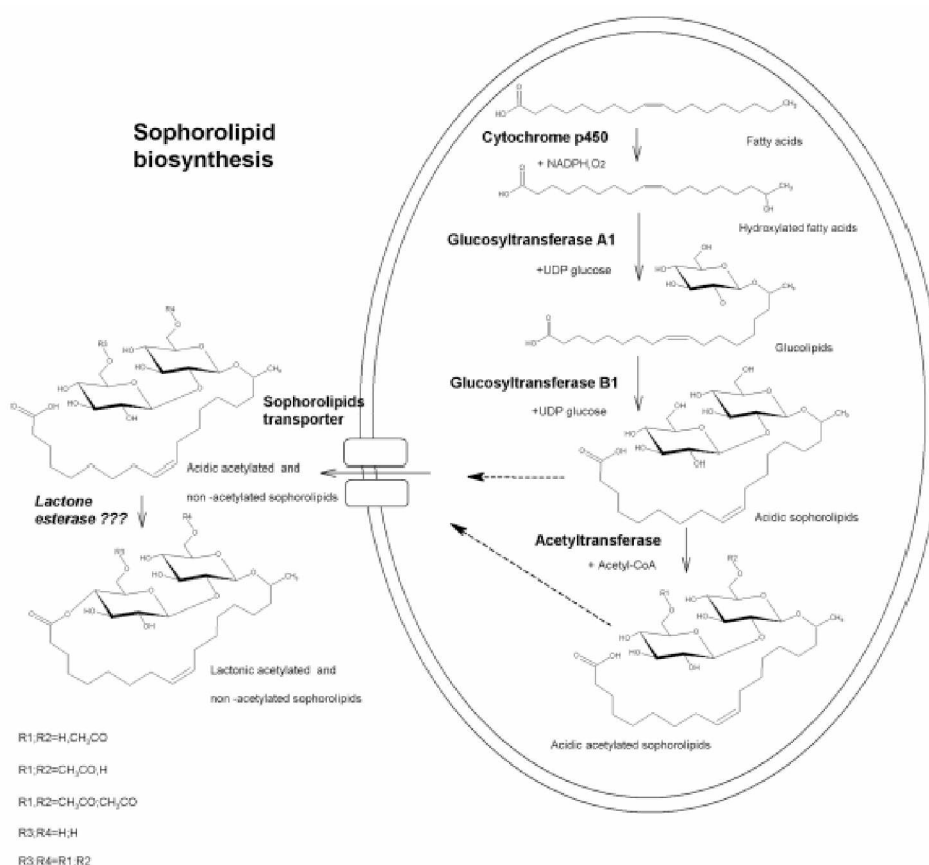
### 1.6.1. Biossíntese de soforolipídio

A biossíntese de soforolipídio ocorre na fase estacionária do crescimento das leveduras quando submetidas a condições limitantes de nitrogênio e dissociada do crescimento celular. Na presença de fontes de carbono hidrofóbica a *Starmerella bombicola* sintetiza os soforolipídios por meio de uma hidroxilação do ácido graxo presente no meio, podendo ser de várias origens: suplementado na forma de ácido graxo, n-alcenos, álcool, aldeído, triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos, que serão metabolizados até seu correspondente ácido graxo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Na ausência de fontes de carbono, o ácido graxo se forma através da síntese *de novo*, a partir da acetil-CoA. O processo de ativação dos ácidos graxos ocorre através da hidroxilação de sua porção carbono terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), essa hidroxilação é mediada pela enzima citocromo monooxigenase P450 pertencente à família CYP52 (CYP52M1), que é expressa exclusivamente na fase estacionária do crescimento do microrganismo, dependente do fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) ligado à membrana celular, conduzindo à formação do correspondente ácido graxo hidroxilado correspondente. Este pode ser metabolizado por  $\beta$ -oxidação quando a concentração de glicose for baixa e utilizada para a manutenção da célula em vez da síntese de soforolipídio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Nos próximos dois estágios, duas moléculas de glicose serão ligadas ao ácido graxo ativado. A primeira é ligada (posição C1') ao  $\omega$  grupo hidroxila ou  $\omega-1$  do ácido graxo pela ação da Glicosiltransferase I (UgtA1). As reações requerem que a glicose seja ativada na forma de uridina difosfato glicose (UDP-glicose), que atua como doador de grupamentos de glicosil. No passo seguinte, uma segunda glicose é ligada glicosidicamente à primeira glicose (posição C2') pela Glucosiltransferase II (UgtA2). Ambas enzimas, UgtA1 e UgtA2, são expressas em grandes quantidades no início da fase estacionária. A glicose fornecida no meio não é diretamente incorporada na estrutura do soforolipídio e sim metabolizada pela via glicolítica,

sendo que a glicose do sofrorolípido é formada a partir da gliconeogênese (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). O produto da segunda reação de glicosilação é o sofrorolípido na sua forma ácida não acetilada, mais reações de acetilação e lactonização promovem variações estruturais. A acetilação da sofrorose nas posições C6 'e C6'' é mediada pela ação da acetiltransferase. O processo de lactonização ocorre por meio de uma reação de esterificação entre o agrupamento carboxílico do ácido graxo e o grupo hidroxil C4 ", sendo possível ocorrer mais raramente no C6 'ou C6", e a enzima responsável pela lactonização ocorre pela ação de uma lactonesterase ligada à parede celular (figura 2). O processo de excreção do sofrorolípido ainda não foi completamente compreendido, sendo que pode ocorrer a partir da formação de vesículas, mediadas possivelmente por transportadores passivos ou ativos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Mecanismo metabólico de biossíntese de sofrorolípido pela *S. bombicola* Fonte: Adaptado de CIESIELSKA *et al.*, (2013), pag. B.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Ensaio de produção de sofrolipídios pela *Starmerella bombicola* utilizando óleo vegetal e resíduos agroindustriais {"Corn steep liquor" (CSL), melão de cana-de-açúcar e "Olive mill wastewater" (OMW)} como substituintes dos compostos sintéticos (glicose e extrato de levedura), comumente usados no meio de cultura para produção de biossurfactante.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Substituir componentes do meio de cultura sintético por resíduos agroindustriais;
- Avaliar a redução da tensão superficial e o aumento do crescimento celular em meios contendo resíduos como substrato através de testes em *erlenmeyer*;
- Verificar o desempenho da melhor condição de meio de cultura para a produção de biossurfactantes e analisar o comportamento da produção, redução da tensão superficial e o aumento do crescimento celular em biorreatores da levedura *Starmerella bombicola*;

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Microrganismo e sua manutenção**

Para a realização do presente estudo, foi utilizada uma cepa da levedura *Starmerella bombicola*, que foi mantida em microtubos de 2 mL à - 80°C, com glicerol, de forma a manter o metabolismo da levedura nos mais baixos níveis. A cepa foi retirada do estoque 10 minutos antes de ser utilizada nos experimentos.

### **3.2. Produtos Químicos e Reagentes**

Para a condução dos experimentos foram utilizados em grau analítico produtos químicos (extrato de levedura, glicose e ureia), solventes (n-hexano, acetato de etila, isopropanol) e resíduos agroindustriais {"corn steep liquor" (CSL), melão de cana-de-açúcar e "olive mill wastewater"(OMW)}, que foram fornecidos pelo Laboratório de Fermentações, do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, localizado na cidade de Braga, em Portugal.

Óleo de soja e óleo de oliva foram obtidos nos supermercados locais da cidade de Braga, em Portugal.

### **3.3. Preparo do pré-inóculo**

Nos testes em *erlenmeyer*, foram preparados 50 mL de meio de cultura em frascos de 100 mL, o meio era composto por 100 g/L glicose, 10 g/L extrato de levedura e 1 g/L ureia, com pH ajustado para o valor de 6. Todo esse sistema foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Posteriormente inoculou-se 100 µL do estoque da cepa de *Sarmerella bombicola*, preparando-se o pré-inóculo. Os frascos foram mantidos na temperatura de 30°C por 48 horas em rotação de 180 rpm (SHAH *et al.*, 2017).

Para os testes em biorreator foram feitos dois pré-inóculos: um contendo 50 mL de meio (100 g/L glicose, 10 g/L extrato de levedura e 1 g/L ureia e pH 6), com as mesmas características do pré-inóculo utilizado nos testes em *erlenmeyer*. Após 48 horas, uma alíquota de 10 mL {5% (v/v)} do primeiro frasco foi colocada no pré-inóculo (2) com as mesmas condições dos meios de cultivo relatados anteriormente, porém, com o volume total de 100 mL. Este meio foi mantido a 30°C por 48 horas em rotação de 180 rpm antes de ser totalmente inserido no biorreator.

### **3.4. Preparo dos meios de cultura**

Para cada experimento conduzido foi desenvolvido uma composição diferente de cada meio de cultura, entretanto, o volume total dos frascos era de 200 mL de meio cultura com pH 6, que foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, os frascos contendo os meios de cultura eram inoculados com 10 mL {5% (v/v)} do pré-inóculo para serem incubados a 30°C por 144 ou 168 horas, com rotação de 180 rpm. Os diferentes tipos de meios testados para investigar a produção de soforolipídios pela levedura estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Variação da composição de cada meio de cultura (a, b, c, d) em Erlenmeyer de acordo com cada ensaio realizado.

| <b>Meio</b>  | <b>Composição</b>                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1°<br>Ensaio | (a) 100 g/L óleo de soja, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                 |
|              | (b) 100 g/L óleo de oliva, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                |
|              | (c) 100 g/L OMW, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                          |
|              | (d) 100 g/L óleo de oliva + óleo de soja, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia. |
| 2°<br>Ensaio | (a) 50 g/L melaço, 100 g/L óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                      |
|              | (b) 100 g/L melaço, 100 g/L óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                     |
|              | (c) 150 g/L melaço, 100 g/L óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                     |
|              | (d) 200 g/L melaço, 100 g/L óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.                     |
| 3°<br>Ensaio | (a) 5 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.                                        |
|              | (b) 10 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.                                       |
|              | (c) 15 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.                                       |
|              | (d) 20 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.                                       |



- 
- (a) 25 g/L óleo de soja, 5 mL de CSL, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.
- 4° (b) 50 g/L óleo de soja, 5 mL de CSL, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.
- Ensaio (c) 75 g/L óleo de soja, 5 mL de CSL, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.
- (d) 100 g/L óleo de soja, 5 mL de CSL, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia.
- 

Para os testes em *erlenmeyer* e em biorreatores, o CSL foi feito à uma quantidade de 20% (v/v), ou seja, adicionou-se 20 mL de CSL e o restante foi preenchido com água destilada, a fim de se obter um volume final de 100 mL. O pH do frasco contendo o CSL foi corrigido para o valor de 6 e, em seguida, autoclavou-se separadamente os meios de cultura e o biorreator nas condições de 121°C por 15 minutos. A adição do CSL foi feita no momento do inóculo.

### **3.5. Biorreator**

Nos testes em biorreator foi utilizado o biorreator-fermentador combinado da Bioengineering, Inc. Desta forma, foram preparados inicialmente 2 L de meio de cultura com a composição de 50 g/L de melaço, 1 g/L de ureia, 100 g/L óleo de soja, 25 g/L de CSL e pH = 6. Era inoculado 100 mL {5% (v/v)} do pré-inóculo. Durante o processo fermentativo não foi feito controle de pH, mantendo a temperatura constante de 30°C, rotação a 400 rpm e aeração em 2 L/min.

### **3.6. Análise da tensão superficial**

Nos testes em *erlenmeyer*, assim como os realizados em biorreatores, foram extraídas uma alíquota de 10 mL a cada 24 horas, durante o processo fermentativo que variava sua duração entre 144 e 168 horas dependendo do ensaio. Os tubos falcon de 15 mL foram centrifugados e o precipitado obtido, retirado para a análise de densidade ótica (DO) e o sobrenadante para avaliação da tensão superficial utilizando um Tensiômetro KRÜSS K20 (KRÜSS GmbH, Alemanha) equipado com um anel de platina Du Noüy de 1,9 cm. Nos ensaios experimentais em biorreatores, realizou-se testes em amostras sem diluição e com diluição de

1:20, 1:50 e 1:100 para verificar diferenças de concentração de biossurfactante em função do tempo.

### **3.7. Análise do Crescimento celular**

O crescimento celular foi avaliado pela densidade ótica (DO) à 600 nm (nanômetros). A análise foi feita com o precipitado obtido pela centrifugação dos tubos contendo 10 mL de meio retirados a cada 24 horas tanto dos *erlenmeyers*, como no biorreator. O sobrenadante foi recolhido. O precipitado foi ressuscitado em água e agitado para uma melhor homogeneização. Após a ressuspensão foram retirados alíquotas 250 µL em triplicatas dos tubos e colocados em microplacas para serem analisados em espectrofômetro.

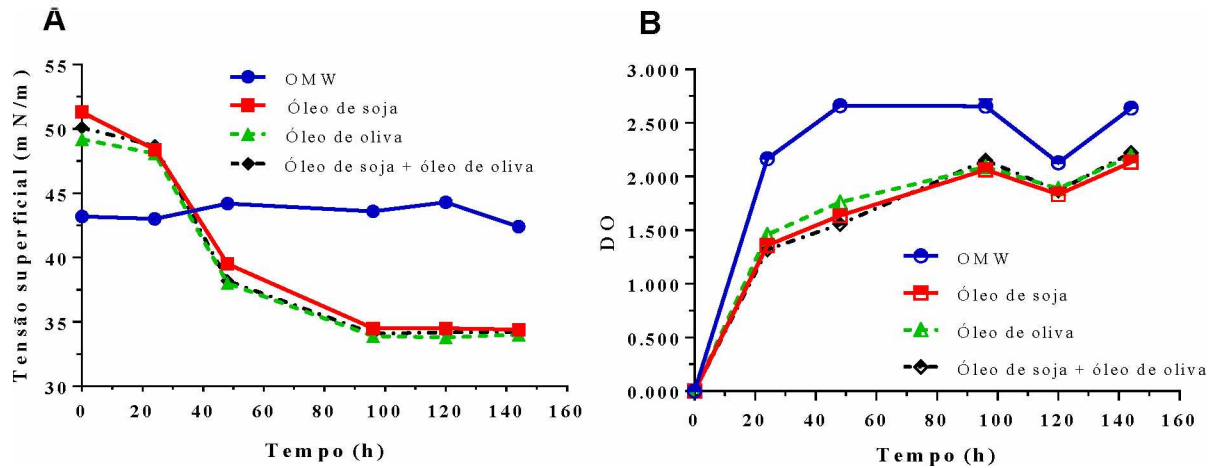
### **3.8. Extração do biossurfactante**

Para a extração dos biossurfactantes, os meios em que foram obtidos os melhores resultados de redução da tensão superficial, foram centrifugados a 8000 rpm por 30 minutos, retirando-se subsequentemente o sobrenadante para a próxima etapa. Os sofrolipídios do meio fermentado foram extraídos com o uso de acetato de etila e isopropanol na proporção de 8:2, dependente da quantidade de sobrenadante extraídos após a centrifugação.

Posteriormente, o meio foi agitado com a ajuda de um agitador magnético para obter uma mistura homogênea dos compostos. Adiante, a camada contendo o biossurfactante foi separada esperando-se a evaporação dos solventes para obter o resíduo no fundo do frasco, que foi lavado com n-hexano para remoção dos óleos e substâncias hidrofóbicas remanescentes. O biossurfactante extraído foi ressuscitado em água permitindo, em um momento seguinte, a sua liofilização, processo necessário para tornar possível a sua pesagem e análise da concentração de biossurfactante produzida.

#### 4. RESULTADOS

Primeiramente, avaliou-se o desempenho da *Starmerella bombicola* quando inserida em meio sintético (Tabela 1, 1º Ensaio) juntamente com óleo de soja, óleo de oliva e OMW. Os quatro tipos de meios variaram em relação ao óleo ou OMW utilizado, sendo que, a quantidade de glicose, extrato de levedura e ureia mantinham-se os mesmos em todos os frascos.



**Figura 7.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas em frascos com OMW, óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + óleo de oliva, ambos a 100 g/L, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 horas.

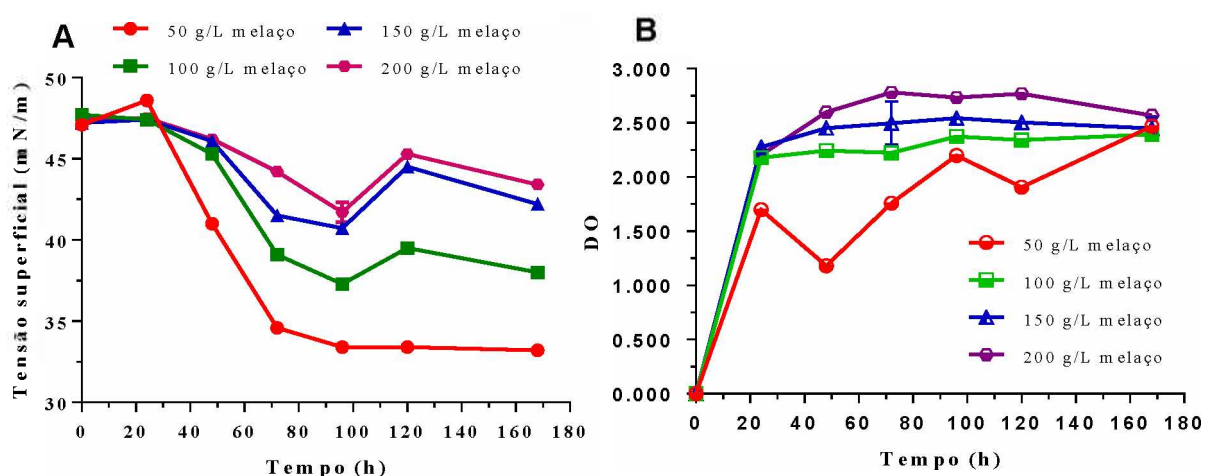
Os valores de tensão superficial antes do processo fermentativo, ou seja, tempo zero foram de 43,20; 51,30; 49,20 e 50,10 mN/m, para os meios contendo OMW, óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + óleo de oliva respectivamente e após 144 horas de fermentação os valores da tensão superficial foram de 42,40; 34,40; 34,00 e 34,20 mN/m, para os meios contendo OMW, óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + óleo de oliva respectivamente (Figura 7A) e os valores de crescimento celular destes meios foram de 2,639; 2,133; 2,191; 2,222 nm respectivamente (Figura 7B).

Os meios, mostrados apresentaram perfis semelhantes para redução da tensão superficial e crescimento celular, ao contrário do frasco contendo OMW que não produziu biosurfactante suficiente para a redução da tensão superficial, pois a diminuição mínima da tensão superficial

aceita para considerar um microrganismo como produtor de biossurfactante é de 8 mN/m (GUDIÑA *et al.*, 2015).

Portanto, para posteriores ensaios iria ser adotado o uso do óleo de soja ou óleo de oliva ou óleo de soja + óleo de oliva, mas dentre as opções possíveis optou-se por selecionar somente o óleo de soja, porque, apesar de apresentar um efeito semelhante ao mostrado nos outros óleos, o seu preço de mercado é menor do que o do óleo de oliva, fazendo com que haja redução do custo de produção, o principal responsável por essa escolha para auxiliar na produção do biossurfactante.

Em seguida, fez-se a substituição da glicose pelo resíduo melaço (Tabela 1, 2º ensaio). Para as quatro variáveis de meios de cultura foi utilizado a mesma concentração de óleo de soja, extrato de levedura e ureia, diferenciando-se entre si apenas nas concentrações do melaço adicionado.

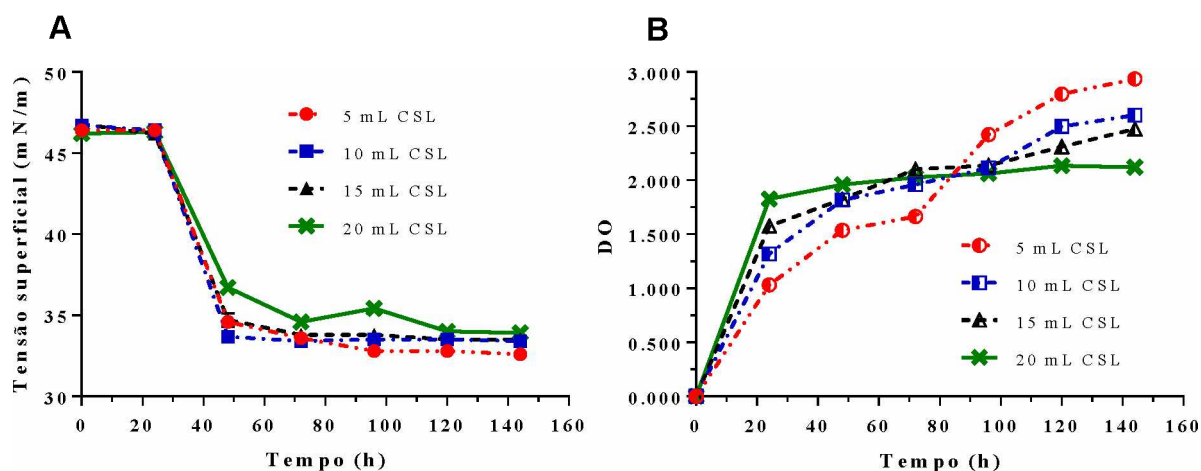


**Figura 8.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmarella bombicola* cultivadas em frascos com 50, 100, 150 e 200 g/L de melaço, 100 g/L de óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 168 h.

Após 168 horas de fermentação, o meio de cultivo que apresentou o melhor perfil de redução da tensão superficial foi o que continha 100 g/L de óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia e 50 g/L de melaço, reduzindo de 47,10 no tempo zero para um valor de 33,20 mN/m no final da fermentação (Figura 8A). Apesar do crescimento celular ter

apresentado oscilação durante a fermentação, não prejudicou a redução da tensão superficial e ainda apresentou um valor de DO no final de 2,468 nm (Figura 8B) que está próximo do número encontrado no ensaio passado. Ao contrário do experimento anterior, foi mais fácil observar qual meio apresentou melhor desempenho, uma vez que, não houveram outros frascos com valores semelhantes ao frasco contendo 50 g/L.

A primeira substituição de componente realizada foi a da glicose com o melaço. A próxima etapa foi a troca do extrato de levedura que é uma fonte orgânica de nitrogênio pelo CSL, um subproduto da indústria de moagem úmida de milho. Os quatro tipo de meios variaram no volume de CSL adicionado, sendo que a quantidade de melaço, óleo de soja e ureia foi mantida a mesma em todos os frascos, assim como mostrado na Tabela 1, 3° ensaio.



**Figura 9.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas em frascos com 5, 10, 15 e 20 mL de CSL, 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 h.

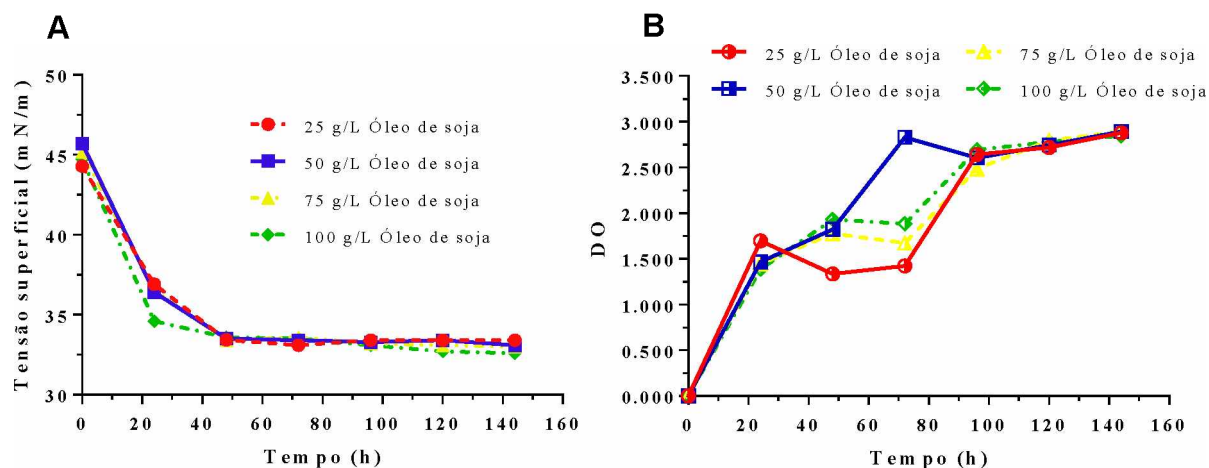
O perfil de redução da tensão superficial foi semelhante para todos os meios com valores no tempo zero de 46,40; 46,70; 46,80; 46,20 nN/m; chegando a valores de 32,60; 33,40; 33,50; 33,90 mN/m após 144 horas de fermentação para os meios com 5, 10, 15, 20 mL de CSL respectivamente (Figura 9A). Em relação ao crescimento celular, o meio com 5 mL de CSL apresentou maior crescimento chegando a valores de 2,936 nm após 144 horas, frente a valores de 2,601; 2,474; 2,119 nm para os meios com 10, 15 20 mL de CSL respectivamente (Figura 9B).

**Tabela 2.** Resultado das tensões superficiais após diluições de 1:5 e 1:10 das amostras dos meios de 5, 10, 15, 20 mL de CSL no tempo de 144 horas.

| Amostra   | Tensão superficial (mN/m) |              |
|-----------|---------------------------|--------------|
|           | 1:5                       | 1:10         |
| 5 mL CSL  | 32,40 ± 0,05              | 34,00 ± 0,12 |
| 10 mL CSL | 35,53 ± 0,12              | 38,10 ± 0,10 |
| 15 mL CSL | 39,00 ± 0,18              | 42,80 ± 0,22 |
| 20 mL CSL | 39,10 ± 0,31              | 41,80 ± 0,33 |

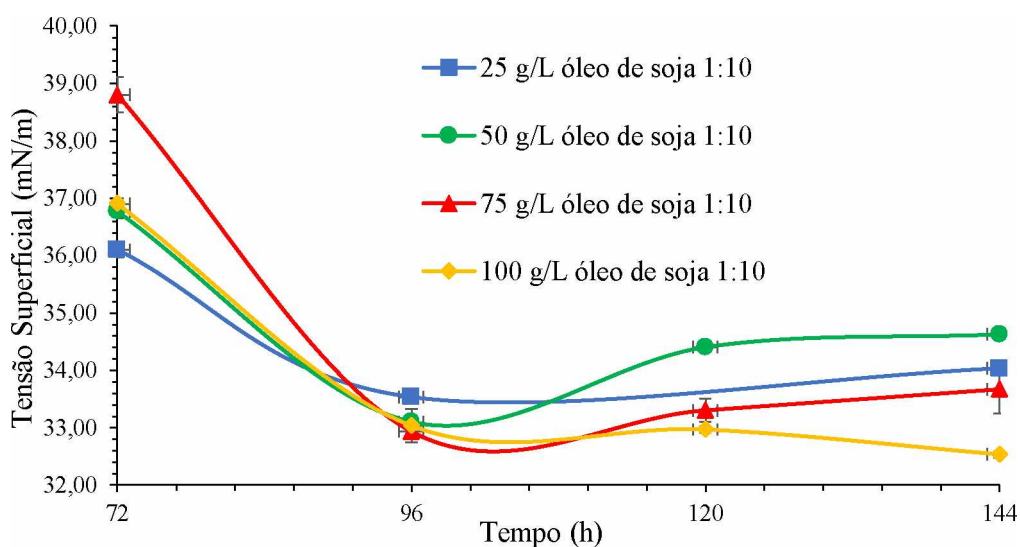
Apesar do meio que contém 5 mL de CSL ter apresentado uma ligeira diferença no valor da tensão superficial com os demais meios avaliados, não foi possível selecioná-lo como um meio ótimo para a produção do biossurfactante, pelo fato da diferença dos valores de tensão superficial com os outros frascos terem sido pequena, por isso procedeu-se fazer diluições de 1:5 e 1:10 com as amostras retiradas no tempo de 144 horas para verificar em qual permanecia a redução da tensão superficial. As diluições mostradas na Tabela 2 confirmam que o meio contendo 5 mL de CSL revelou uma maior redução da tensão superficial, mantendo o valor baixo quando comparado aos outros meios quando diluídos em água.

O último ensaio realizado em *erlenmeyers* consistiu-se na avaliação da variação da concentração de óleo de soja no meio contendo como substituintes de glicose (100 g/L) e extrato de levedura (10 g/L) o melaço (50 g/L) e CSL (5 mL), respectivamente. O experimento foi realizado para verificar se, em concentrações mais baixas de óleo de soja, a produção permaneceria a mesma.



**Figura 10.** (A) Avaliação do crescimento celular (DO). (B) Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m). As fermentações foram realizadas com *Starmerella bombicola* cultivadas em frascos com 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melaço, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C e 180 rpm durante 144 h.

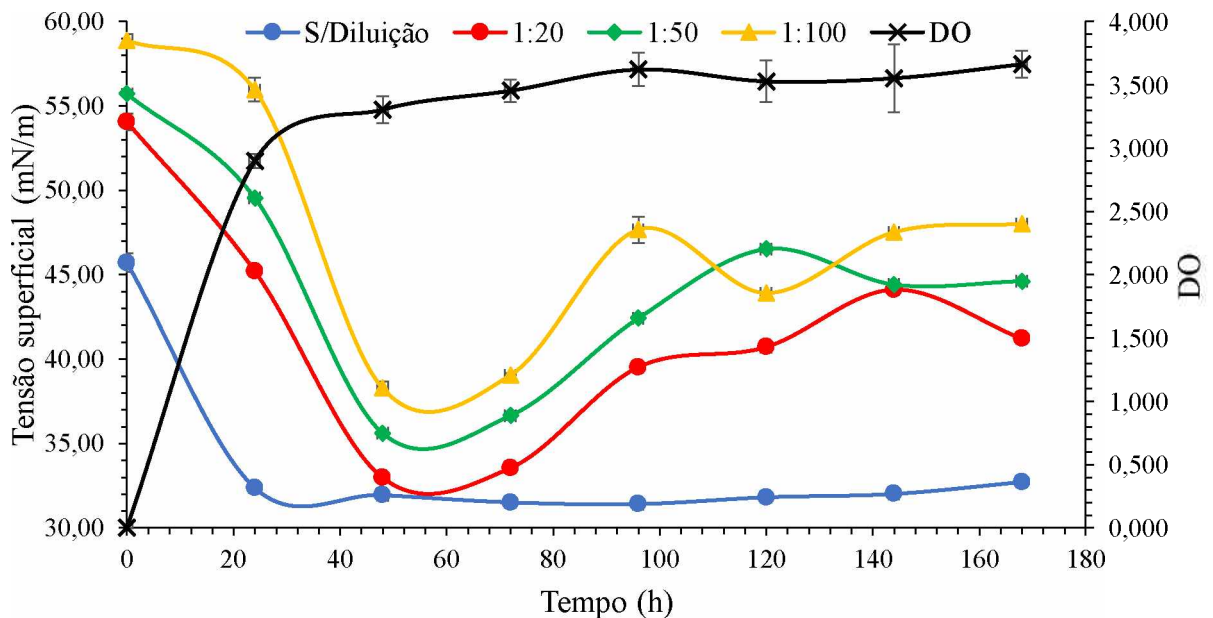
Assim como foi observado nos experimentos anteriores, todos os meios apresentaram valores semelhantes da redução da tensão superficial e de crescimento celular (Figura 10). Os valores da tensão superficial no tempo zero foram de 44,30; 45,70; 45,15; 44,70 mN/m enquanto no tempo de 144 horas foram de 33,4; 33,1; 33,0; 32,6 mN/m para os meios que continham 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja respectivamente (Figura 10A). Outrora os valores de crescimento celular após 144 horas foram de 2,878; 2,892; 2,846; 2,847 nm para os frascos que continham 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja respectivamente (Figura 10B).



**Figura 11.** Valores de tensão superficial analisados nas diluições de 1:10 dos meios com 25, 50, 75 e 100 g/L de óleo de soja nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas.

Tomando como referência os ensaios decorridos anteriormente, o tempo em que a tensão superficial começava a alcançar valores próximos à 33 mN/m eram em 72 horas. Portanto, neste último ensaio foram feitas diluições de 1:10 das amostras desde o tempo de 72 horas para distinguir aquele que possuía a maior produção de biossurfactante. O meio que continha o óleo de soja a 100 g/L foi o que manteve os valores mais baixos de tensão superficial nas diluições (Figura 11). Portanto, manteve-se sua concentração de 100 g/L como feito nos experimentos passados.

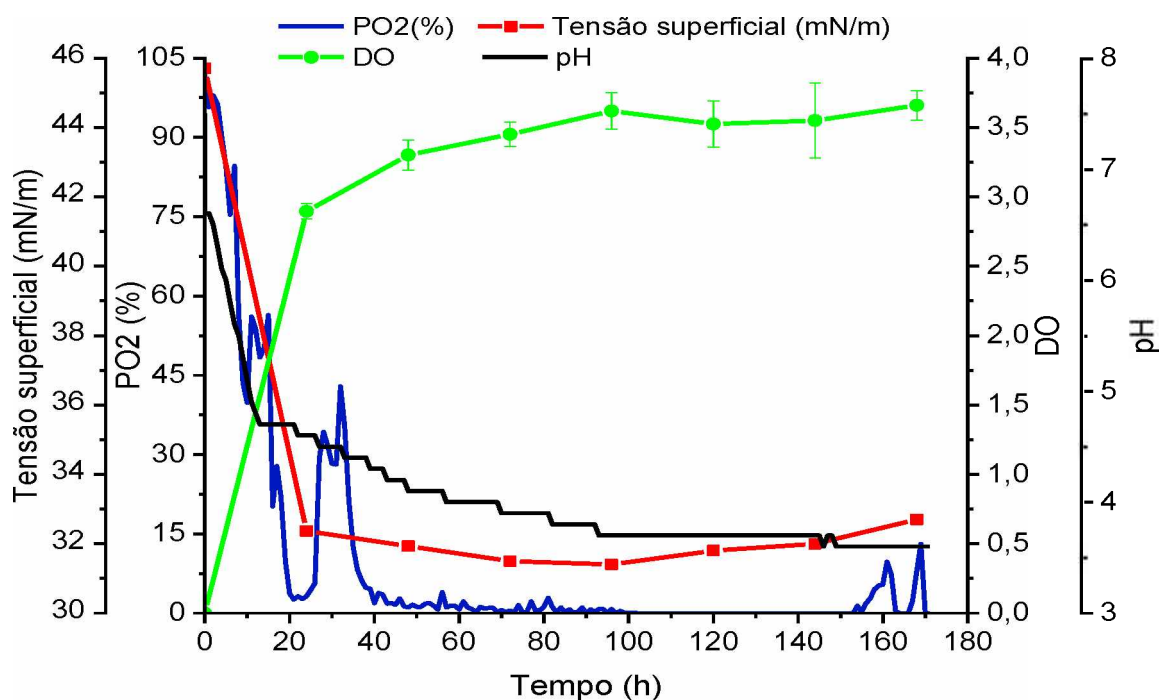
Após serem realizados os ensaios em frascos de *erlenmeyers*, verificou-se que o meio ótimo para ser submetido em teste em biorreator foi o que continha 5 mL de CSL, 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melação e 1 g/L de ureia. No primeiro experimento realizado no biorreator o processo fermentativo ocorreu em 168 horas e cada 24 horas foram retiradas amostras para realizar a análise de densidade ótica e redução da tensão superficial, sendo que nesta última também realizou diluições de 1:20, 1:50 e 1:100.



**Figura 12.** Avaliação do crescimento celular (DO) e tensão superficial (mN/m), sem e com diluição de 1:20, 1:50 e 1:100, em fermentação realizada durante 168 horas com *Starmerella bombicola* em biorreator com 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melação, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C, 400 rpm sem controle de pH e aeração em 2 L/min.



Depois de 24 horas de avaliação, o valor da tensão superficial alcançou o valor de 32,37 mN/m para a amostra sem diluição, essa redução aconteceu mais rápido que nos experimentos decorridos anteriormente. Os valores de densidade ótica também foram maiores que os experimentos passados, pois após 168 horas de fermentação o crescimento chegou à 3,659 nm; em testes anteriores os valores de DO não passavam de 3.000 nm (Figura 12).



**Figura 13.** Avaliação da redução da tensão superficial (mN/m), consumo de oxigênio {PO<sub>2</sub>(%)}, densidade ótica (DO) e comportamento do pH, em fermentação realizada durante 168 horas com *Starmerella bombicola* em biorreator com 100 g/L de óleo de soja, 50 g/L de melação, 5 mL de CSL e 1 g/L de ureia a 30°C, 400 rpm sem controle de pH e aeração em 2 L/min.

Quando verificamos a Figura 13, é visto que ao longo da fermentação, os valores de pH diminuem de 7,5 para 3,6. No que tange à porcentagem de oxigênio no meio, observa-se que há uma redução ao longo do processo fermentativo, chegando até o valor de zero em alguns momentos, com exceção ao período entre 20 a 40 horas de fermentação em que há um pico maior na porcentagem de oxigênio.

Depois da extração e liofilização dos biossurfactantes em todos os ensaios realizados, foram determinadas as concentrações de sofrorolípídios extraídos dos meios. Somente para os

meios que desempenharam bons resultados tiveram seus biossurfactantes extraídos. Os valores das concentrações de sorofosfolipídios obtidos podem ser visualizados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração de sorofosfolipídios extraídos nas otimizações realizadas após processo de liofilização.

| <b>Meios</b>                                                                               | <b>Concentração (g/L)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 100 g/L óleo de soja, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.  | 1,0000                    |
| 100 g/L óleo de oliva, 100 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia. | 1,2505                    |
| 50 g/L melão, 100 g/L óleo de soja, 10 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ureia.        | 0,5670                    |
| 5 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melão e 1 g/L de ureia.                          | 3,8230                    |
| Biorreator - 5 mL CSL, 100 g/L óleo de soja, 50 g/L de melão e 1 g/L de ureia.             | 5,1823                    |

## 5. DISCUSSÃO

A adição de óleos e OMW à 100 g/L foi feita no primeiro ensaio (Figura 7), pois Daverey e Pakshirajan (2009) mostraram que o uso de ácido oleico a 100 g/L é ideal para a produção de biomassa e soforolipídio. A adição de óleo ocorreu, pois, a adição de substrato lipofílico em combinação com uma fonte hidrofílica, faz com que a produção de biossurfactantes pela levedura seja maior, pelo fato das fontes de carbono hidrofóbica e hidrofílica serem supridas no meio de cultura (SOUZA et al., 2017b). A fonte de carbono lipofílica é normalmente inserida na porção hidrofóbica do soforolipídio e, em caso de ausência, a parte hidrofóbica pode ser sintetizada a partir de outras fontes de carbono a partir da síntese *de novo*, no entanto, menor será a produção de biossurfactante (ALBRECHT; RAU; WAGNER, 1996).

Tanto o óleo de soja quanto o óleo de oliva são constituídos primariamente de triglicerídeos ou triacilglicerol, variando em sua estrutura o ácido graxo utilizado, podendo ser ácido oleico, linoleico ou linolênico para o óleo de soja e ácido oleico, linoleico, linolênico, palmítico, palmitoleico ou esteárico para o óleo de oliva (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006; PERKINS, 1995). Segundo Garcia-ochoa e Casas (1999), a levedura é capaz de produzir moléculas soforolipídicas utilizando os ácidos graxos obtidos dos triglicerídeos. Devido a isso, os meios contendo estes óleos apresentaram maior produção de biossurfactante e, conseqüentemente, maior redução da tensão superficial.

O OMW não apresentou um bom resultado no primeiro ensaio, devido a sua baixa quantidade de ácidos graxos em sua composição. O principal componente do OMW é a água (83-94%) e, em menor quantidade, possui lipídeos, carboidratos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, taninos, pectinas e minerais (DERMECHE *et al.*, 2013; MEKSI *et al.*, 2012). Portanto, a quantidade de lipídeos presentes não são suficientes para serem integrados na porção

hidrofóbica do biossurfactante, por isso menor foi a sua produção, em consequência menor foi a redução da tensão superficial.

Os valores da produção do biossurfactante (Tabela 3) para os meios com óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + oliva não apresentaram significativas diferenças entre seus valores após 144 horas, mas os valores de ambos foram mais baixos em comparação à produção feita por Daverey e Pakshirajan (2009), que utilizando óleo de soja e glicose foram produzidos 15 g/L de soforolípido em frascos de Erlenmeyer pela *Starmerella bombicola*. As comparações demonstram que o processo de extração do soforolípido não foi eficaz, por isso houve níveis baixos de concentração de biossurfactante liofilizado. Uma das razões é que nos experimentos a extração de biossurfactantes foi realizada no final da fermentação ao contrário do que foi feito por Daverey e Pakshirajan (2009), que extraíam a cada 24 horas, assim após 144 horas já poderia ter ocorrido a degradação do biossurfactante, diminuindo o rendimento do produto, por isso menor a concentração do composto na extração (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

Em um segundo momento objetivou a substituição da glicose por um resíduo industrial que fosse capaz de fornecer uma fonte de carbono hidrofílica, para assim, ajudar a reduzir o custo de produção. O composto hidrofílico em questão, tinha que ser capaz de fornecer glicose para a formação do dímero de soforose e se ligar ao ácido graxo hidroxilado, pela ação das enzimas glicosiltransferase um e dois, para assim formar o biossurfactante. Portanto, é de extrema importância um substrato que forneça fontes de carbono hidrofílico para suplementação do meio de cultura para bons índices de produção de biossurfactante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O melão utilizado nas análises continha cerca de 50% de açúcares totais (dados não mostrados), sendo em sua maioria sacarose, assim como retratado por Hashizume *et al.* (1966). O meio que possuía 50 g/L de melão, foi o que apresentou o melhor resultado na redução da

tensão superficial (33,20 mN/m) e obteve também bom crescimento celular (2,468 nm), isto comparado com os outros meios que apresentavam maior concentração de melação.

Os resultados encontrados nesta otimização corroboram com o que foi demonstrado por Daverey e Pakshirajan (2009), que demonstraram que a maior produção de soforolípido foi alcançado quando a concentração do melação estava a 50 g/L. A uma concentração de 50 g/L, o melação foi capaz de fornecer fonte de carbono para o crescimento da biomassa e produção de soforolípido, mas em concentrações maiores que 50 g/L causou efeitos negativos na produção do biossurfactante (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

A concentração de soforolípido extraído no meio que possuía 50 g/L de melação foi de 0,5670 g/L. O valor obtido foi menor do que o conseguido na otimização anterior, utilizando óleo de soja, óleo de oliva e óleo de soja + óleo de oliva. A diferença existente entre os dois experimentos foi semelhante ao encontrado por Daverey e Pakshirajan (2009), em que a produção de soforolípido utilizando melação e óleo de soja foi de 9 g/L, valor menor do que o produzido em meio contendo glicose e óleo de soja, que foi de 15 g/L, isto se deve pelo fato do melação apresentar outros constituintes em sua composição, como matéria orgânica, proteína, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, que podem afetar a biossíntese do biossurfactante. Entretanto a levedura mostrou ser capaz de utilizar o melação como uma fonte de carbono para a síntese do soforolípido.

Embora o perfil de diminuição da concentração de soforolípido apresentado seja semelhante ao do estudo citado no paragrafo anterior, o valor extraído de biossurfactante foi menor. O motivo para isto ter ocorrido é o mesmo apresentado na extração dos meios que continham os óleos.

Uma vez que já tenha ocorrido a substituição da glicose pelo melação de cana-de-açúcar e a adição de óleo de soja para auxiliar a produção de soforolípido foi válido tentar diminuir mais o custo de produção trocando o extrato de levedura pelo “corn steep liquor”. O CSL é um

concentrado viscoso, subproduto da indústria de moagem úmida do milho, que contém em sua composição água (45 à 55%), vitaminas, aminoácidos, minerais e outros estimulantes do crescimento, sendo utilizado como fonte de nitrogênio em vários meios e condições de cultura celular (LIGGETT; KOFFLER, 1948).

Para verificar o desempenho do CSL na produção de soforolípido pela *Starmerella bombicola*, foi adicionado diferentes volumes do composto no meio de cultura. O meio contendo 5 mL de CSL (Figura 9), foi o que apresentou melhor resultado na redução da tensão superficial (32,60 mN/m) e no crescimento celular (2,936 nm).

O efeito do CSL como fonte de nitrogênio na produção de soforolípido mostra que em volumes acima de 5mL de CSL, induz um efeito negativo na produção de biossurfactante. Este resultado está de acordo com o de Garcia-ochoa e Casas (1999), no qual a diminuição da quantidade de fonte de nitrogênio favoreceu maior produção de soforolípido, pois favorece o metabolismo celular para a produção de metabólitos.

A concentração de soforolípido extraído no meio que possuía 5 mL de CSL foi de 3,8230 g/L. O valor obtido foi maior do que o conseguido nos ensaios utilizando óleo de soja, óleo de oliva, óleo de soja + óleo de oliva e melação de cana-de-açúcar. Este resultado mostra que a substituição do extrato de levedura por CSL pode ser feita, visto que, a concentração de soforolípido extraída foi maior do que as obtidas nos experimentos anteriores, mesmo a extração do biossurfactante sendo realizada apenas no final da fermentação.

Houve a tentativa de analisar se a *Starmerella bombicola* conseguiria desempenhar uma boa atividade em meios contendo menores concentrações de óleo de soja. Como pode ser visto nas Figuras 10 e 11, mesmo com a diminuição da concentração de óleo de soja utilizada, o meio contendo 100 g/L de óleo de soja foi o que apresentou maior redução da tensão superficial (32,53 mN/m – 1:10) e bom crescimento celular (2,832 nm).

A produção de soforolípido é altamente influenciada pela fonte de carbono hidrofóbico fornecida no meio (GARCIA-OCHOA; CASAS, 1999; VAN BOGAERT *et al.*, 2007). A Figura 10 ilustra a influência do óleo de soja na produção de biossurfactante e no crescimento da levedura, mostrando que o óleo a 100 g/L é a melhor opção tanto para a produção de biomassa de levedura quanto para a produção de soforolípido. Como visto por Daverey e Pakshirajan (2010), abaixo da concentração ótima de óleo de soja, a redução da tensão superficial é reduzida como visto na Figura 11.

Apesar do bom resultado da densidade óptica durante os ensaios feitos com melaço de cana-de-açúcar, CSL e óleo de soja, houve variações do crescimento celular durante a fermentação. O fato ocorrido pode ser explicado, pelo fato do acúmulo de soforolípídios alterar as propriedades reológicas do caldo de fermentação, que se tornou menos expandido e turbulento. Devido as alterações, houve dificuldade na correta amostragem à medida que a fermentação progrediu, explicando as variações na biomassa observada após a fase de crescimento (DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1992).

Uma vez obtido um meio ótimo para a produção de biossurfactante em *erlenmeyer*, objetivou-se verificar o desempenho do meio em biorreator. Como pode ser visto na Figura 12, a redução da tensão superficial começou já na fase exponencial de crescimento da levedura e continuou na fase estacionária corroborando com Ciapina, (2008), que o verificou o mesmo perfil durante a produção de biossurfactante pela *Rhodococcus erythropolis*.

A maior produção de biossurfactante ocorreu entre os períodos de 48 a 72 horas, onde os valores de tensão superficial dos meios sem e com diluição alcançaram valores próximos entre eles. Após o tempo de 72 horas os valores de tensão superficial nas amostras com diluição começaram a aumentar, pois após este tempo houve uma limitação do substrato no meio de fermentação, assim começando a catabolizar o produto para utilizá-lo como nutriente (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

Na Figura 13 equiparou-se o desempenho da redução da tensão superficial e do crescimento celular com os parâmetros da presença de oxigênio no meio de cultura e o perfil de desempenho do pH. A redução do pH ocorreu de forma mais drástica de 7,5 para 4,7 durante a fase exponencial de crescimento, provavelmente devido ao consumo de fonte de nitrogênio juntamente com a geração de ácidos graxos como demonstrado por Daverey e Pakshirajan (2009). Durante a fase estacionária da fermentação, o pH reduziu menos, obtendo alguns pontos de estabilidade, sendo seu maior ponto estável no valor de 3,7.

A quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura foi medida pela pressão parcial de O<sub>2</sub>. É notório que o oxigênio dissolvido diminuiu bruscamente na fase exponencial do crescimento porque a proliferação é um processo aeróbico. Durante a fase estacionária o oxigênio dissolvido permaneceu baixo, pois o oxigênio é essencial para a biossíntese de soforolípidios, principalmente devido ao citocromo P450 monooxigenase que necessita do oxigênio molecular para sua atividade, para assim, promover a hidroxilação do carbono terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ) do ácido graxo para posterior ligação à molécula de glicose pela enzima glicosiltransferase I (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Um perfil curioso da curva de oxigênio dissolvido foi notado entre 24 e 40 horas de fermentação, onde houve um aumento na quantidade de oxigênio dissolvido no meio. Apesar da literatura não mostrar explicações para esse efeito, é possível deduzir que neste período, transição da fase exponencial para a fase estacionária, ocorreu limitação de nitrogênio, fato que aumentou a atividade das enzimas envolvidas na produção de soforolipídio, como descrito por Daverey e Pakshirajan (2010), fazendo com que a levedura sofresse alteração do seu metabolismo, por isso existe um pico no aumento do oxigênio dissolvido no meio.



## 6. Conclusão

A substituição feita dos componentes sintéticos presentes no meio de cultura para a síntese de soforolipídio por resíduos agroindustriais pode ser considerada bem sucedida tanto em frascos de *erlenmeyer* quanto em biorreatores. Os valores de tensão superficial, importante para demonstrar a produção de biossurfactante, apresentaram valores baixos e semelhantes aos retratados pela literatura. Os valores de crescimento celular mostrou que a levedura é capaz de apresentar um bom crescimento celular. Além disso, a suplementação do meio de cultura com óleo de soja, que apresenta baixo custo de compra, teve um importante papel para melhorar a produção de soforolipídio, como retratado em outros estudos. Apesar da extração dos soforolipídios ter apresentado diferenças nas concentrações obtidas quando comparado aos trabalhos de outros pesquisadores, estas diferenças foram devidas provavelmente ao modo de extração adotado. Portanto, é importante continuar realizando mais ensaios, controlando variáveis como o pH e também analisar o consumo do substrato para obter uma melhor análise do processo fermentativo, para assim melhorar ainda mais o processo produtivo de soforolipídio. Outro ponto é buscar solução para os obstáculos encontrados durante o processo de extração de biossurfactante, para aumentar sua eficiência de extração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, A. et al. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1367–1371, mar. 2001.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 25 maio 2010.
- ABU-RUWAIDA, A. S. et al. Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 4, p. 315–324, 1 jan. 1991.
- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 67–73, 1996.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 10 maio 1968.
- BANAT, I. M. et al. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 80–88, jan. 1991.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 1995.
- BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. **Olive Oil Composition**. [s.l.: s.n.]. v. 739568
- CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, 1 set. 2013.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234–3252, 7 mar. 2014.
- CHAKRABARTI, S. **BACTERIAL BIOSURFACTANT: CHARACTERIZATION, ANTIMICROBIAL AND METAL REMEDIATION PROPERTIES DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN LIFE SCIENCE**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://ethesis.nitrkl.ac.in/3113/1/Sneha\\_thesis-\\_full.pdf](http://ethesis.nitrkl.ac.in/3113/1/Sneha_thesis-_full.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2018.
- CIAPINA, E. M. P. **Elisa mara prioli ciapina produção de biossurfactante por**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–6, 1 jan. 1984.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 195–203, 1 jan. 2007.
- DAS, S. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2014.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 663–674, 2009.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2090–2101, 2010a.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed

hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 246–253, 2010b.

DAVILA, A.-M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.-P. Kinetics and Balance of a Fermentation Free From Product Inhibition-Sophorolipid Production By *Candida Bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 6–11, 1992.

DE OLIVEIRA, M. R. et al. Biosynthesis And Production Of Sophorolipids. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 11, p. 133–143, 2014.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 6–7, p. 641–646, jun. 2004.

DERMECHE, S. et al. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1532–1552, 2013.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1 mar. 1997.

DROUIN, C. M.; COOPER, D. G. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 1, p. 86–90, 5 jun. 1992.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208–217, 1 jan. 1992.

FRACCHIA, L. et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144–162, 2015.

GARCIA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production.pdf. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 613–621, 1999.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. **RSC Advances**, v. 5, n. 110, p. 90960–90968, 2015.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPEL, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301–5, 1 ago. 1984.

HASHIZUME, T. et al. Constituents of Cane Molasses: Part 1. Separation and identification of the nucleic acid derivatives. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 319–329, 1966.

HATHA, A. A. M.; EDWARD, G.; PATTANATHU RAHMAN, K. S. M. Microbial Biosurfactants – Review. **J.Mar. Atmos. Res.**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2007.

HIRATA, Y. et al. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 142–146, 1 ago. 2009.

HLIHOR, R. M. et al. Bioremediation: An Overview on Current Practices, Advances, and New Perspectives in Environmental Pollution Treatment. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–2, 2017.

HU, Y.; JU, L.-K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 263–272, 18 maio 2001.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 220–222, 3 jan. 2006.

KITAMOTO, D. et al. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 315–328, 1 out. 2009.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 1–2, p. 12–20, 1 mar. 2002.

LEE, K. H.; KIM, J. H. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 3, p. 263–266, mar. 1993.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. CORN STEEP LIQUOR IN MICROBIOLOGY. **Bacteriological reviews**, v. 12, n. 4, p. 297–311, dez. 1948.

LILLIENBERG, L. et al. HEALTH EFFECTS OF TANK CLEANERS. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 53, n. 6, p. 375–380, 4 jun. 1992.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127–33, 1 jul. 2001.

MEKSI, N. et al. Olive mill wastewater: A potential source of natural dyes for textile dyeing. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 103–109, 2012.

MUKHERJEE, A. K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 330–335, 1 set. 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 1 jan. 2005.

MUTHUSAMY, K. et al. **Biosurfactants: Properties, commercial production and application** Current Science Current Science Association, , 2008. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/pdf/24100627.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2018

NEIDLEMAN, S. L.; GEIGERT, J. Biotechnology and oleochemicals: Changing patterns. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 290–297, fev. 1984.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 1 maio 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002.

OLIVERA, N. L. et al. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 542–548, 1 set. 2003.

PERKINS, E. G. **Composition of Soybeans and Soybean Products**. [s.l.] AOCS Press, 1995. v. I

RANGARAJAN, V.; SEN, R. An inexpensive strategy for facilitated recovery of metals and fermentation products by foam fractionation process. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 104, p. 99–106, 1 abr. 2013.

ROBERT, M. et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871–874, dez. 1989.

RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609–618, 1 abr. 2006.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1413–1417, 1 out. 1998.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34–38, 1 jan. 2014.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. **GEBJ-29, accepted version** **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://astonjournals.com/gebj>><<http://astonjournals.com/gebj>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

SANTA ANNA, L. M. et al. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91–93, p. 459–67, 2001.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SEN, R. (ED.). **Biosurfactants**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2010. v. 672

SHEPHERD, R. et al. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207–217, 21 jun. 1995.

SHEPPARD, J. D.; COOPER, D. G. The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. **Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)**, v. 48, n. 3, p. 325–36, 1990.

SILVA, R. et al. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 15 jul. 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 1 jan. 2007.

SOUZA, E. C. et al. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 525–530, 2 out. 2017a.

SOUZA, K. S. T. et al. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 373–382, 2017b.

SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J.; TULLOCH, A. P. *Torulopsis bombicola* sp. n. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n. 1, p. 129–133, dez. 1970.

THIMON, L. et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS microbiology letters**, v. 128, n. 2, p. 101–6, 1 maio 1995.

VAN BOGAERT, I. N. A. et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1 jan. 1991.

VIJAYAKUMA, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181–192, 1 maio 2015.

WEST, C. C.; HARWELL, J. H. Surfactants and subsurface remediation. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 12, p. 2324–2330, dez. 1992.