

Avaliação do crescimento de *Candida lipolytica* em água do mar suplementada com fontes de carbono e nitrogênio

Leoni Asfora Sarubbo¹, Galba Maria Campos-Takaki¹

Resumo

O crescimento da levedura *Candida lipolytica* foi avaliado em meios de cultura à base de água do mar (YSW - yeast salt water), suplementados com fontes de carbono e nitrogênio visando à preparação de meios de baixo custo de possível aplicação em processos biotecnológicos. Os estudos foram realizados utilizando água do mar (com aproximadamente 26% de salinidade) suplementada com fosfato, sulfato e uréia, além de óleo de babaçu e glicose como fontes de carbono. As fermentações foram realizadas durante 240 horas à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. Os resultados obtidos demonstraram que os meios YSW-GPU (yeast salt water-glucose, phosphate, urea) e YSW-BPSU (yeast salt water-babassu, phosphate, sulphate, urea) apresentaram melhores crescimentos, onde a adição do sulfato de amônio demonstrou exercer maior influência sobre o crescimento celular que a uréia. Observou-se também que a glicose não é uma fonte de carbono superior ao óleo de babaçu para o crescimento de *C. lipolytica* nas condições aqui estudadas.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, água do mar, fontes de carbono e de nitrogênio

Candida lipolytica growth in sea water supplemented with carbon and nitrogen sources

Summary

The growth of the yeast *Candida lipolytica* in based sea water media (YSW- yeast salt water) supplemented with different carbon and nitrogen sources was evaluated with the aim of prepare low-cost media for application in biotechnological processes. Studies were carried out in sea water (approximately 26% salinity) containing phosphate, sulfate, urea and babassu oil and glucose as carbon sources. Fermentations were conducted during 240 hours at 28°C, under 150 rpm of orbital agitation. Results obtained showed that the media YSW-GPU (yeast salt water- glucose, phosphate, urea) and YSW-BPSU (yeast salt water- babassu, phosphate, sulphate, urea) were better for growth, where the addition of ammonium sulfate exerted a bigger influence on the cellular growth over the urea. It was also observed that glucose was not superior as the carbon source than babassu oil for *C. lipolytica* growth under the tested conditions.

Key-Words: *Candida lipolytica*, sea water, carbon and nitrogen sources

Introdução

A oxidação de hidrocarbonetos por microrganismos ocorre em meios muito simples e por toda uma diversidade de condições ambientais. Assim, quando a água do mar é suplementada com hidrocarbonetos, fornece condições para o crescimento, promovendo o metabolismo bioquímico dos microrganismos. Água do mar quando suplementada com 0,1% de fosfato de ferro e amônio (FeNH_4PO_4) foi utilizada para o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, possibilitando o seu emprego como uma excelente solução mineral (Zobell, 1946).

Devido ao excelente conteúdo em sais minerais, a água do mar tem sido empregada para o crescimento de microrganismos degradadores de petróleo e seus derivados, como também para a produção de metabólitos utilizados para minimizar a contaminação causada pelo derramamento de óleos. Reisfeld *et al.* (1972) utilizaram a água do mar suplementada para isolamento e estudos de fatores que afetam a cinética da dispersão do óleo cru na água do mar, pelos microrganismos.

O interesse por microrganismos com capacidade para degradar óleo cru na água do mar tem-se evidenciado em estudos realizados por Horowitz *et al.* (1975), que utilizaram a água do mar em meios de cultura para avaliar o crescimento de bactérias com capacidade de degradar óleos com diferentes fontes de carbono para outro microrganismo.

Boyle e Reade (1983) caracterizaram dois polissacarídeos extracelulares, que foram produzidos por bactérias isoladas da zona intertidal, que foram cultivadas em meio com água do mar, devido à expectativa de mercado para os biosurfactantes produzidos em água do mar, com grande potencial e alta demanda pela indústria petrolífera. Os autores sugerem que os polissacarídeos podem ser utilizados como controladores de motilidade nos processos de recuperação de óleos, de substâncias com viscosidade altamente específica e tolerância a condi-

¹ Departamento de Química / Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-NPCIAMB, UNICAP, Rua Nunes Machado, n. 42, Bloco J Boa Vista CEP: 50050-590

ções extremas, temperaturas, sanilidade e pH, além do comportamento reológico adequado.

A água do mar artificial suplementada com 1% de n-hexadecano foi usada como meio de cultura para o crescimento de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, fase perfeita de *Candida lipolytica*, que produziu neste meio um complexo lipídeo-carboidrato-proteína extracelular, termoestável, com propriedades emulsificantes (Zinjarde *et al.*, 1997). Recentemente, Vance-Harrop (2000) descreveu a produção de agentes surfactantes utilizando água do mar como meio basal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Candida lipolytica* em meios de cultura à base de água do mar, suplementados com fontes de carbono e nitrogênio, visando à preparação de meios de baixo custo, com possível aplicação em processos biotecnológicos.

Materiais e métodos

Microrganismo: foi utilizada nos experimentos a amostra de *Candida lipolytica* 1055, proveniente da coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE, e atualmente mantida na Coleção UCP(Universidade Católica de Pernambuco). A amostra foi mantida sob refrigeração a 4°C, em tubos de ensaio contendo meio Yeast Mold Agar (YMA), descrito por Cirigliano & Carman (1984, 1985), e repicada periodicamente para obtenção de uma cultura jovem.

Meios de crescimento: cinco meios de cultura contendo água do mar foram formulados para avaliação das condições de crescimento do microrganismo. A composição dos meios está descrita na TABELA 1.

TABELA 1 - Composição dos meios de cultivo contendo água do mar

Constituintes (300mL de meio)	YSW-BPU	YSW-GPU	YSW-BPSU	YSW-BPSU ₁	YSW-GPS
Fosfato de potássio monobásico a 10 mM	0,408g	0,408g	0,408g	0,408g	0,408g
Sulfato de amônio a 1%	-----	-----	0,300g	0,300g	0,300g
Uréia	0,300g	0,300g	0,300g	0,750g	-----
Glicose a 1%	-----	3,00g	-----	-----	3,00g
Óleo de babaçu a 5%	15,0mL	15,0mL	15,0mL	15,0mL	-----
Água do mar (sal. 26-29%)	150,0mL	150,0mL	150,0mL	150,0mL	150,0mL
Água destilada	150,0mL	150,0mL	150,0mL	150,0mL	150,0mL
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3

YSW-BPU (yeast salt water, babassu, phosphate, ureia); **YSW-GPU** (yeast salt water, glucose, phosphate, urea); **YSW-BPSU** (yeast salt water, babassu, phosphate sulfate, urea); **YSW-BPSU₁** (yeast salt water, babassu, phosphate, sulfate, ureia); **YSW-GPS** (yeast salt water, glucose, phosphate, sulfate)

(-----): Ausência

Condições de cultivo: as fermentações foram realizadas utilizando-se Erlenmeyers de 1000 mL de capacidade, contendo 300 mL de meios específicos de produção. A cada meio adicionou-se óleo de babaçu à razão de 5%. A todos os meios adicionou-se 3,0mL do inóculo, contendo 10⁴ células/mL. As culturas foram incubadas a 28°C sob agitação orbital de 150 rpm durante 240 horas. A cada 24 horas foram colhidas alíquotas de 7,0 mL para realizar contagem de células, e pH.

Determinação da biomassa: a viabilidade celular foi verificada através de contagem de células em Câmara de Neubauer.

Determinação do pH: o pH das amostras coletadas ao longo da fermentação foi determinado por potenciometria.

Determinação da salinidade: a determinação da salinidade da água do mar utilizada nos meios YSW

foi utilizada pelo método Mohr-Knudsen, descrito por Strickland & Parsons (1965), e ajustada com água destilada a fim de se obter uma salinidade de 26-29%. Nesse método, a salinidade é dosada por titrimetria. 1,0 mL da amostra é titulada com uma solução de AgNO_3 de 37,11 g/l e 20% diluída (concentração final de 7,422 g/l), padronizada com alíquotas de 5,0 mL, em triplicata, de água do mar padrão mundial diluída a 20% (Standard Sea Water Service Institute of Oceanographic Sciences) que possui uma concentração de cloretos conhecidos, na presença de 5 gotas do indicador cromato de potássio a 8%. A presença de cloretos é indicada pelo aparecimento de um precipitado vermelho tijolo de Ag_2CrO_4 , no final da titulação. O volume de AgNO_3 37,11 g/l e 20% diluída gastos na titulação é anotado para ser utilizado no cálculo para determinação da percentagem de cloretos, sendo dada pela fórmula:

$$\% \text{Cl} = \frac{V_A \times \% \text{Cl}_p}{V_M \times V_p}$$

Onde:

V_A = volume da solução de AgNO_3 37,11 g/l e 20% diluída gastos na titulação da amostra;

V_p = volume da solução de AgNO_3 37,11 g/l e 20% diluída gastos na titulação da água do mar padrão mundial;

$\% \text{Cl}_p$ = percentagem de cloretos na água do mar mundial;

V_M = volume de água do mar padrão mundial utilizada na padronização da Solução de AgNO_3 37,11 g/l e 20% diluída.

A salinidade é calculada pela fórmula:

$$\% \text{ salinidade} = \% \text{Cl} \times 1,80655$$

Determinação da velocidade máxima de crescimento: a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) foi calculada empregando a fórmula:

$$\mu_{\text{max}} = \frac{\ln x - \ln x_0}{T - T_0} \quad (\text{Pirt, 1975})$$

Onde:

X = Biomassa final;

X_0 = Biomassa inicial;

T = Tempo final;

T_0 = Tempo inicial

O Tempo de Geração inicial (T_G) foi obtido pela fórmula:

$$T_G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{max}}}$$

Resultados e discussão

O uso de óleos vegetais e seus subprodutos, quando utilizados como substratos para crescimento microbiano, apresentam vantagens sobre os carboidratos, uma vez que são fontes de carbono mais baratas, com alta percentagem de carbono utilizável e não possuem efeito tóxico sobre as células; não sendo voláteis, não sofrem perdas pela evaporação durante a fermentação (Zinjarde *et al.*, 1997). A água do mar tem sido bastante utilizada pela literatura como um meio de cultura econômico, tendo em vista a sua composição em sais minerais (Boyle e Reade, 1983). Recentemente, Vance-Harrop (2000) e Vance-Harrop *et al.* (1999) demonstraram que a água do mar, com salinidade de até 13%, pode ser utilizada para a produção microbiana como meio basal alternativo e econômico, utilizado para diferentes substratos.

Nesse sentido, os estudos realizados com *C. lipolytica*, utilizando os meios denominados de YSW-BPU, YSW-GPU, YSW-BPSU, YSW-BPSU₁ e YSW-GPS, tendo como base a água do mar, suplementados com fosfato, sulfato e uréia, além de óleo de babaçu e glicose como fontes de carbono, foram avaliados para o crescimento da levedura. As fermentações foram acompanhadas durante 240 horas, à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. Observou-se que o meio YSW-BPU (yeast salt water babassu, phosphate, urea) apresentou biomassa com ausência de “fase lag”, com fase exponencial de 24 a 48 horas, ocorrendo em seguida a fase estacionária de crescimento, que perdurou até 240 horas. A velocidade máxima de crescimento foi de 0,15 h⁻¹, com um tempo de gera-

ção de $4,6 \text{ h}^{-1}$. O pH do meio decaiu até 120 horas, permanecendo em torno de 3,5 até o final da fermentação. Enquanto que o mesmo meio, utilizando glicose como fonte de carbono, apresentou uma “fase lag” que durou as primeiras 24 horas, seguida de exponencial, iniciando a fase estacionária a partir de 96 horas de crescimento. A velocidade máxima de crescimento foi de $0,17 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de $4,07 \text{ h}^{-1}$. O pH, coincidentemente decaiu a partir das 96 horas, quando iniciou a fase estacionária de crescimento. É provável que o babaçu como fonte de carbono tenha induzido a uma maior velocidade de crescimento, contudo, rapidamente, entrou em fase estacionária (Figura 1 - A e B).

O meio YSW-BPSU, contendo 0,1 % de uréia, apresentou o melhor crescimento celular dentre todos os outros meios. Observou-se uma “fase lag” com 24 horas e exponencial até 96 horas, seguido de estacionária até 240 horas de fermentação. A velocidade máxima de crescimento foi de $0,17 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de $4,07 \text{ h}^{-1}$. O pH variou de 6,57 com 24 horas, continuando a decair para 3,0, até atingir 2,67 com 240 horas de fermentação (FIGURA 1 - C). A adição concomitante de sulfato de amônio, fosfato e uréia a 0,1 % demonstrou ser uma associação mais favorável ao crescimento celular de *C. lipolytica*. Esse meio demonstrou que as vias de acesso de utilização de fosfato, sulfato e uréia contribuíram para maior formação de biomassa, devido a uma maior disponibilidade de fonte de carbono e nitrogênio, sem causar repressão catabólica.

Por outro lado, o meio YSW-BPSU₁, contendo 0,3 % de uréia, demonstrou bom crescimento celular, relativamente ao meio anterior (YSW-BPSU), contudo o aumento de uréia causou uma discreta inibição do crescimento de *C. lipolytica*,

entrando em fase estacionária com 48 horas de crescimento. A velocidade máxima de crescimento foi de $0,2 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de $3,46 \text{ h}^{-1}$ (FIGURA 1 - E). O pH do meio baixou de 6,38 na primeira aferição para 2,65 na última, às 240 horas. Os resultados desse meio sugerem que o aumento da concentração de uréia para 0,3 % não foi benéfico ao crescimento celular.

O meio YSW-GPS, que apresenta glicose como fonte de carbono, demonstrou um desenvolvimento celular limitado, atingindo o máximo de biomassa com 240 horas de fermentação. O cultivo em meio YSW-GPS apresentou duas fases exponenciais de crescimento. Observou-se uma velocidade máxima de crescimento de $0,2 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de $1,98 \text{ h}^{-1}$ para a primeira fase e de $0,071 \text{ h}^{-1}$ com tempo de geração de $9,76 \text{ h}^{-1}$ para a segunda fase, demonstrando um perfil diáuxico (FIGURA 1 - D). Com relação ao pH, este baixou de 5,31 nas primeiras 24 horas, decaindo para 2,67 com 240 horas.

Conclusões

Comparando-se todos os meios utilizados, observou-se que a glicose não é uma fonte de carbono superior ao óleo de babaçu para *C. lipolytica*. Os meios YSW-GPU e YSW-BPSU apresentaram os melhores crescimentos da levedura, onde a adição do sulfato de amônio demonstrou exercer melhor influência sobre o crescimento celular do que a uréia.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o suporte financeiro do CNPq e FINEP.

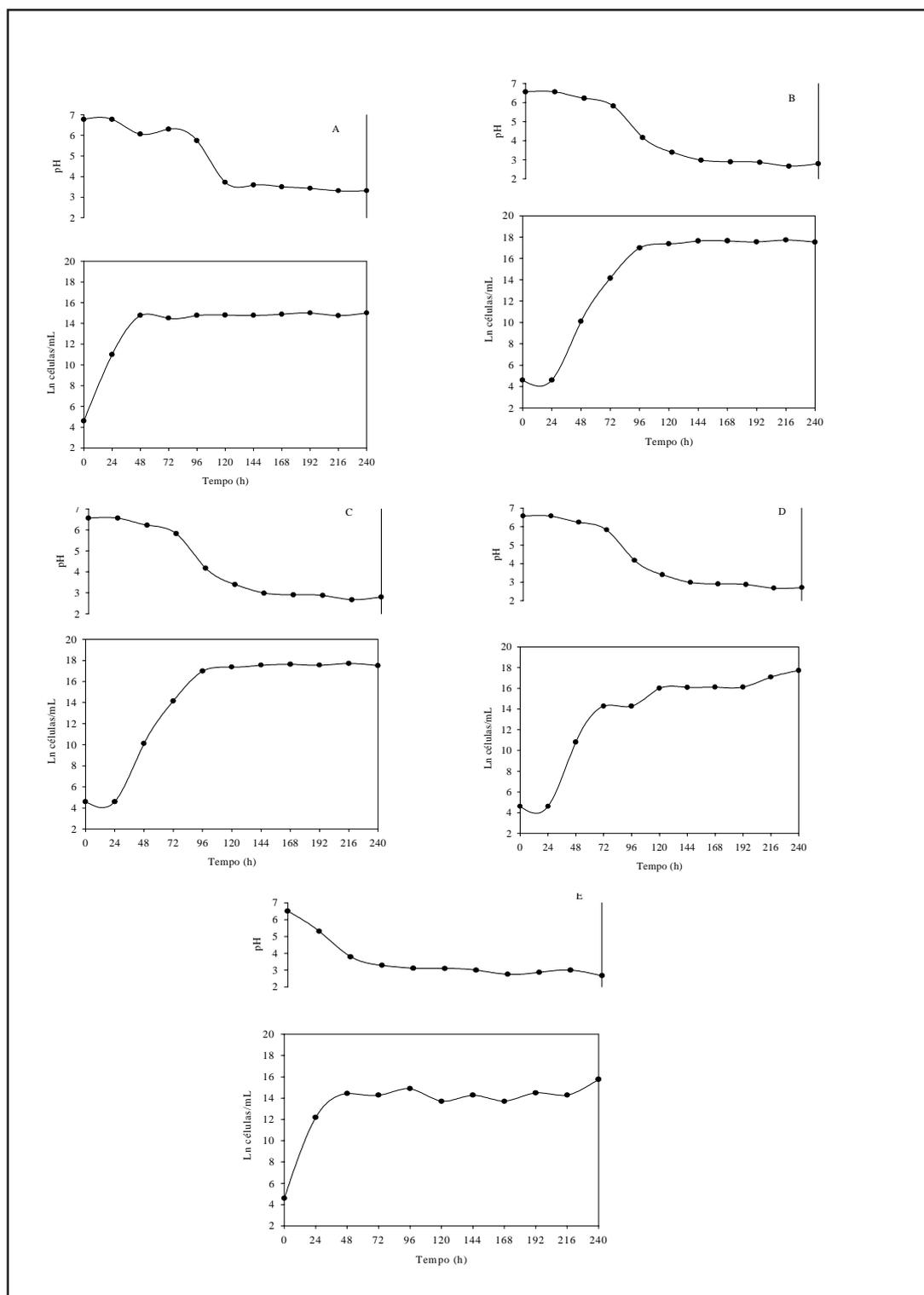


FIGURA 1 - Curva de Crescimento e de pH de *Candida lipolytica* nos meios YSW-BPU (yeast salt water, babassu, phosphate, ureia) (A); YSW-GPU (yeast salt water, glucose, phosphate, urea) (B); YSW-BPSU (yeast salt water, babassu, phosphate sulfate, urea) (C); YSW-GPS (yeast salt water, glucose, phosphate, sulfate) (D) e YSW-BPSU₁ (yeast salt water, babassu, phosphate, sulfate, ureia) (E)

Referências

- Boyle, CD.; Reade, AE. Characterization of two extracellular polyssacharides from marine bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, 46: 392-399, 1983.
- Cirigliano, MC; Carman, GM. Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Env. Microbiol.**, 50: 846 - 850, 1985.
- Cirigliano, MC; Carman, GM. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Env. Microbiol.**, 4: 747-750, 1984.
- Horowitz, A ; Gutnick, D.; Rosenberg, E. Sequential growth of bacteria on crude oil. **Appl. Env. Microbiol.**, 30: 10 - 19; 1975.
- Pirt, SJ. **Principles of Microbe and cell cultivation**, London: Blackwell Scientific Publications, 214-215. 1975.
- Reisfeld, A.; Rosenberg, E.; Gutnick, D. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. **Appl. Env. Microbiol.**, 24: 363 - 368; 1972.
- Strickland, JDH.; Parsons, TR. A Manual of Sea Water Analysis. **Bulletin Fisheries Research Board of Canada**, 125, 1965.
- Vance-Harrop, MH. Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes. Tese de Mestrado, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2000.
- Vance-Harrop, MH.; Sarubbo, LA; Carneiro-da-Cunha, MG.; Buarque de Gusmão, N.; Campos-Takaki, G. M. Produção de biossurfactantes em meio de cultra de baixo custo suplementado com óleo de milho, **Revista Symposium**, ano 3, n.2: 23-27, 1999.
- Zinjarde, S.; Chinnathambi, S.; Lachke, AH., Pant, A. Isolations of na emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. **Lett. Appl. Microb.**, 24: 117 - 121, 1997.
- Zobell, CE. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, 10: 1 - 49, 1946.