

## Área: Ciência de Alimentos

# PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES POR *Aspergillus fumigatus* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) UTILIZANDO UREIA E ÓLEO DE SOJA

Valquíria Quoos de Moraes, Éllen Francine Rodrigues, Laura Delise da Silva Tochetto, Lisiane Franken, Luísa Bortoluzzi, Telma Elita Bertolin, Christian Oliveira Reinehr, Luciane Maria Colla\*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

\*E-mail: [lmcolla@upf.br](mailto:lmcolla@upf.br)

## RESUMO

Os emulsificantes possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, que atuam na interface das emulsões diminuindo a tensão superficial. São aplicáveis em vários setores industriais e podem ser produzidos por microrganismos ou através de síntese enzimática por enzimas produzidas por microrganismos. A produção de bioemulsificantes é influenciada por fatores como a natureza da fonte de carbono, a temperatura e o tipo de microrganismo utilizado. Objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de uréia e óleo de soja sobre a produção de bioemulsificantes através de um Planejamento Fatorial Completo  $2^2$ , utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* em fermentação em estado sólido. As atividades emulsificantes O/A e A/O foram determinadas a fim de caracterizar a produção de bioemulsificantes. Maiores atividades emulsificantes O/A e A/O foram obtidas em 2 d e 6 d de fermentação. Em 2 d, as concentrações ótimas de uréia e óleo de soja foram as inferiores do planejamento (5%), enquanto que em 6 d de fermentação as concentrações de 10% de uréia e óleo de soja resultaram em maiores atividades emulsificantes, indicando que as concentrações ótimas das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas dependem do tempo de processo fermentativo.

**Palavras-chave:** Biossurfactantes, fungo filamentosos, fonte de carbono, fonte de nitrogênio.

## 1 INTRODUÇÃO

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas ativas que aderem à superfície das gotículas formadas durante a homogeneização. Estas moléculas podem ser produzidas biologicamente, através de microrganismos. Os emulsificantes são adicionados para formação

da consistência e textura, dispersão de fases, na solubilização de aromas, para melhorar a capacidade de retenção de ar em misturas e com a finalidade de aumento do volume de massas (ALONSO, 2001). Os alimentos contêm componentes como proteínas, carboidratos e gorduras, além de água. Os emulsificantes tornam possível tornar miscíveis dois componentes anteriormente imiscíveis (ARAÚJO, 2004).

Os bioemulsificantes são compostos produzidos pelos microrganismos a partir de processos fermentativos utilizando como substratos compostos como os óleos vegetais, carboidratos, resíduos industriais, petróleo e derivados. São moléculas anfifílicas que atuam na interface das emulsões, diminuindo a tensão superficial ou atuando como emulsificantes poliméricos os quais impedem a agregação de partículas que desestabilizam as emulsões.

Estes compostos têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura e estabilidade (KIM et al., 2000).

A fermentação em estado sólido é definida como aquela que envolve sólidos na ausência ou quase ausência de água livre; todavia, os substratos devem possuir umidade para suportar o crescimento e metabolismo dos microrganismos (PANDEY, 2003). Esta fermentação tem como vantagens o baixo custo das matérias-primas empregadas, a simplicidade do meio de fermentação e a menor probabilidade de contaminação pela menor quantidade de água presente (ALONSO, 2001; PANDEY, 1992; PANDEY et al., 2003).

A fonte de nitrogênio é essencial para a produção de bioemulsificantes e o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas (HOMMEL et al. 1994).

Objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de uréia e óleo de soja sobre a produção de bioemulsificantes através de um Planejamento Fatorial Completo  $2^2$ , utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* em fermentação em estado sólido.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 Microrganismo, manutenção e preparo do inóculo

O microrganismo *Aspergillus fumigatus* disponível no Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos, foi utilizado neste estudo. O microrganismo foi mantido em tubos com ágar-batata-dextrose (ABD) inclinados sob refrigeração a 4°C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado e em erlenmeyers e incubados a 30°C por 5 d a 7 d.

#### 2.2 Preparo do meio de cultivo e condições experimentais

O meio de cultivo foi composto por 85% de farelo de soja 15 % de casca de arroz. A esta matriz sólida adicionou-se 70 % de solução salina, cuja composição era: 2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L de  $\text{MgSO}_4$  e 10 mL/L de solução traço, composta por 0,63 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg/L de  $\text{MnSO}_4$  e 0,62 mg/L de  $\text{ZnSO}_4$  e água destilada até o volume de 1 L. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C. A umidade foi ajustada em 60% e o pH em 4,5. Ao meio foram adicionadas uréia e óleo de soja como fontes de nitrogênio e indutor, segundo as concentrações do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup> apresentado na Tabela 1.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 25 g de meio inicial e inoculados com  $2 \cdot 10^6$  esporos/g, sendo incubados por 8 d a 30 °C em estufa. A cada 48 h foram coletadas amostras para as determinações analíticas.

#### 2.3 Determinações analíticas

A extração dos bioemulsificantes do meio fermentado foi realizada a partir de 5 g de farelo fermentado, aos quais adicionou-se 30 mL de água destilada a 90 °C seguido de

extração em banho-maria a 50 °C durante 30 min, com posterior filtração em algodão. Os filtrados obtidos foram centrifugados por 15 min com 6000 rpm para separação dos esporos, e novamente filtrados em papel filtro Whatmann 40.

As atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) foram determinadas segundo metodologia proposta por MARTINS et al. (2006). A determinação da atividade emulsificante óleo em água foi realizado em tubos de ensaio, utilizando 3,5 mL de extrato fermentado e 2 mL de óleo de milho. A mistura foi agitada em agitador Vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado óleo em água em espectrofotômetro a 610 nm conforme Equação (1).

A atividade emulsificante água em óleo foi realizada após 24 h de repouso e feita a leitura em paquímetro da altura da emulsão água em óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo) conforme equação (2).

$$AE\ O/A = (ABS\ amostra \times D) - ABS\ branco \quad (1)$$

$$AE\ A/O = (E\ amostra \times D) - E\ branco \quad (2)$$

Sendo:

AE = atividade emulsificante (AE);

O/A = óleo em água;

A/O = água em óleo;

ABS = absorbância;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total;

D = diluição da amostra em água.

## 2.4 Tratamento dos dados e análise estatística

A análise dos resultados foi realizada a partir de Análise de Variância dos adimensionais das atividades emulsificantes nos tempos de maior atividade em comparação com as atividades observadas no tempo inicial de fermentação. Os modelos de regressão, bem como as superfícies de respostas dos resultados de atividade emulsificante adimensionais foram gerados.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as atividades emulsificantes óleo em água (AE O/A) e água em óleo (AE A/O) dos experimentos do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores reais e codificados da matriz de experimentos do PFC  $2^2$  e resultados de

| Exp | (X <sub>1</sub> ) | (X <sub>2</sub> ) | AE óleo/água (UE)* |           |           | AE água/óleo (UE)* |             |             |
|-----|-------------------|-------------------|--------------------|-----------|-----------|--------------------|-------------|-------------|
|     |                   |                   | 0 d                | 2 d       | 6 d       | 0 d                | 2 d         | 6 d         |
| 1   | 5 (-1)            | 5 (-1)            | 1,05±0,44          | 1,98±0,58 | 2,40±0,13 | 5,95±0,15          | 178,90±34,8 | 6,01±0,06   |
| 2   | 10 (+1)           | 5 (-1)            | 1,00±0,00          | 0,42±0,10 | 2,26±0,62 | 6,03±0,10          | 74,15±59,30 | 5,95±0,16   |
| 3   | 5 (-1)            | 10 (+1)           | 1,00±0,00          | 1,80±0,53 | 2,34±0,14 | 5,82±0,10          | 65,47±70,86 | 173,06±32,2 |
| 4   | 10 (+1)           | 10 (+1)           | 1,00±0,00          | 0,51±0,41 | 2,56±0,38 | 6,10±0,05          | 5,94±0,08   | 167,60±7,67 |

X<sub>1</sub>= [Uréia](%); X<sub>2</sub>= [Óleo de soja](%)

\*Resultados média ± desvio padrão

As maiores AE O/A foram encontradas em 2 d de fermentação, nos experimentos 1 (1,98±0,58 UE) e 3 (1,80±0,53 UE), e em 4 d de fermentação no experimento 4 (2,56±0,38 UE). Altas AE A/O foram obtidas em 2 d no experimento 1 (178,90±34,81 UE) e em 6 d para os experimentos 3 (173,06±32,20 UE) e 4 (167,60±7,67 UE).

As maiores AE O/A e A/O foram encontradas nos experimentos com níveis superiores de concentração de óleo de soja e uréia, uma vez que a medida que ocorre a fermentação, maior é a concentração de células, e portanto, maior a necessidade de nutrientes para suprir o crescimento.

A análise de variância (Anova) foi realizada a partir dos adimensionais de atividades emulsificantes calculados relacionando os resultados obtidos nos tempos 2 d e inicial, e 6 d e inicial. A Anova do adimensional T2/T0 da AE óleo/água em função das variáveis do PFC  $2^2$  mostrou que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (15,195) foi superior ao  $F_{\text{tabelado}}$  (6,591) mostrando que o modelo estatístico foi validado, ou seja, que a variação causada pela regressão foi superior à variação causada pelo erro. O mesmo ocorreu com a validação do modelo obtido a partir da análise de variância do adimensional T6/T0 da AE O/A ( $F_{\text{calculado}}$ = 8,324 e  $F_{\text{tabelado}}$ = 6,591).

A Tabela 2 apresenta os efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  sobre os adimensionais T2/T0 e T6/T0 da AE O/A. Em 2 d de cultivo, a

concentração de uréia apresentou efeito linear significativo ( $p < 0,05$ ) e negativo sobre a AE O/A, ou seja, ao passar do nível inferior (5 %) para o nível superior (10 %) de concentração de uréia, houve uma diminuição da atividade emulsificante. Através da Figura 1a, observa que para qualquer concentração de óleo de soja (5 ou 10 %) a melhor concentração de uréia foi de 5 %.

No tempo de 6 d de cultivo os efeitos lineares das concentrações de óleo de soja e uréia foram significativos e positivos em um intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ), ou seja, ao passar do nível inferior (5 %) para o nível superior (10 %) houve um aumento da atividade emulsificante, o que pode ser verificado na Figura 1b, que apresenta a superfície de resposta para este adimensional.

Tabela 2: Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  sobre os adimensionais T2 /T0 e T6/T0 da AE O/A

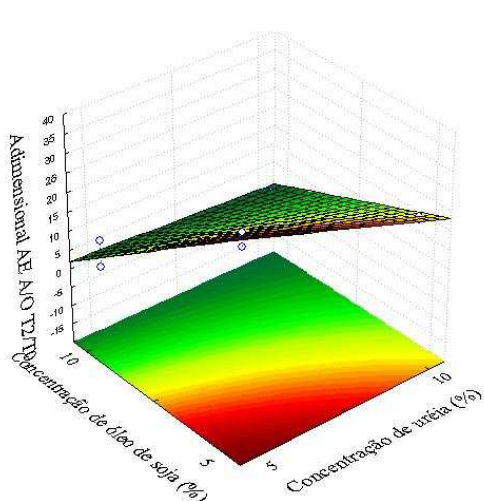
| Fonte de<br>variação | Adimensional T2/T0 |       | Adimensional T6/T0 |       |
|----------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|                      | Efeitos            | p     | Efeito             | p     |
| Média                | 1,178              | 0,001 | 2,410              | 0,000 |
| [uréia] ( $X_1$ )    | -1,601             | 0,003 | 0,560              | 0,016 |
| [OS] ( $X_2$ )       | 0,029              | 0,909 | 0,360              | 0,061 |
| $X_1 \times X_2$     | -0,214             | 0,421 | -0,200             | 0,224 |

A análise de variância dos adimensionais T2/T0 e T6/T0 da AE A/O demonstrou que os modelos de regressão são válidos ( $F_{\text{calculado}}$  de 52,26 para o adimensional T2/T0 e 7282 para o adimensional T6/T0). A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre os adimensionais T2/T0 e T6/T0 AE A/O. No tempo de 2 d de cultivo, a concentração de uréia apresentou efeito negativo sobre o adimensional da AE A/O, pois ao passar do nível inferior (5%) para o nível superior (10%) a atividade emulsificante diminuiu. Já a concentração de óleo de soja apresentou efeito positivo significando que ao passar do nível inferior (5%) para o nível superior (10%) a atividade emulsificante aumentou. No tempo de 6 d de cultivo, o efeito da variável fonte de nitrogênio manteve-se negativo, enquanto que o efeito da fonte de carbono passou a ser positivo.

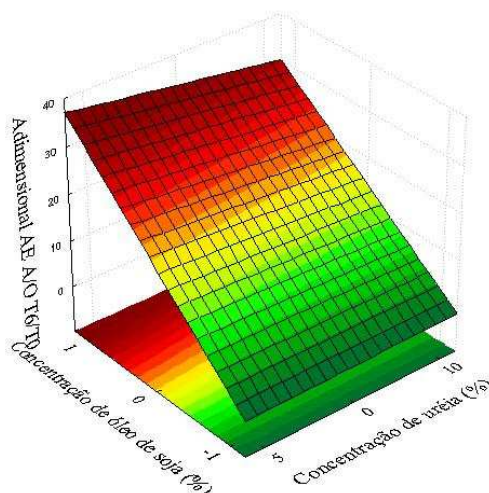
Tabela 3: Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  sobre os adimensionais T2/T0 e T6/T0 da AE A/O

| Fonte de<br>variação | Adimensional<br>T2/T0 |        | Adimensional<br>T6/T0 |        |
|----------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
|                      | Efeito                | p      | Efeito                | p      |
|                      | Média                 | 14,091 | 0,000                 | 15,836 |
| [uréia] ( $X_1$ )    | -9,160                | 0,010  | -2,592                | 0,000  |
| [OS] ( $X_2$ )       | -22,657               | 0,000  | 29,662                | 0,000  |
| $X_1 \times X_2$     | 5,561                 | 0,050  | -2,599                | 0,000  |

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta dos adimensionais T2/T0 (a) e T6/T0 (b) em função das concentrações de uréia e óleo de soja, para a AE O/A. No tempo de 2 d de cultivo, os efeitos lineares negativos indicaram que a variação da concentração dos níveis inferiores (5 %) para os níveis superiores (10 %) ocasionou diminuição da AE A/O. No tempo de 6 d de cultivo, maiores AE A/O foram obtidas com concentração de uréia de 5% de óleo de soja de 10%.



(a)



(b)

Figura 1: Superfície de resposta influência da concentração de uréia e a concentração de óleo de soja sobre os adimensionais T2/T0 (a) e T6/T0 (b) da AE A/O em função das variáveis do PFC  $2^2$

A fonte de carbono interfere na estrutura do biossurfactante, bem como na quantidade produzida (DESAI et BANAT, 1997). Através da análise do PFC 2<sup>2</sup> no tempo 2 d as maiores AE A/O foram obtidas com 5 % de uréia e 5 % de óleo de soja. No tempo de 6 d as maiores AE A/O foram obtidas com 5 % ou 10 % de uréia e 10% de óleo de soja. Isto é uma tendência esperada, uma vez que para que o microrganismo continue a se multiplicar e produzir os biocompostos necessita de quantidades superiores de fontes de carbono e nitrogênio.

Para a AE O/A no tempo de 2 d, melhores resultados foram obtidos com 5 % de uréia e 5 % ou 10 % de óleo de soja. Em 6 d, melhores resultados foram obtidos com 10 % de uréia e 5 ou 10 % de óleo de soja. Assim, verifica-se que a quantidade das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas depende também do tempo de processo fermentativo.

### **3 CONCLUSÃO**

Em 2 d de fermentação, maiores atividades emulsificantes O/A e A/O foram obtidas utilizando-se os níveis inferiores de uréia (5%) e óleo de soja (5%), enquanto que em 6 d de fermentação, as maiores atividades emulsificantes O/A e A/O nos níveis superiores de uréia (10%) e óleo de soja (10%).

### **REFERÊNCIAS**

ALONSO, F. O. M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 3. ed. p.137–160. Viçosa: Editora UFV, 2004.

CAMERON, et al. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 655-659, 1991.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE S. O. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 31, p. 149-253, 2000.



MARTINS, et al. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 61c, p. 721-726, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.

SHAW, D. J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. p. 49-51. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1975.