

Área: Ciência de Alimentos

SELEÇÃO DE INDUTORES E FONTES DE NITROGÊNIO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO *Aspergillus fumigatus*

Éllen Francine Rodrigues, Laura Tochetto, Lisiane Franken, Luísa Bortoluzzi,
Valquíria Morais, 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

RESUMO

Os bioemulsificantes são produzidos por microrganismos como compostos ativos em superfícies ou através de síntese enzimática por enzimas destes. O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais que incluem emulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial. A composição e as características dos bioemulsificantes são influenciadas pela natureza dos indutores e fontes de nitrogênio utilizadas, assim como os fatores de pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo sendo extremamente importantes na quantidade e na qualidade dos biossurfactantes produzido. Objetivou-se o estudo de indutores e fontes de nitrogênio para a produção de biossurfactantes utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* via fermentação em estado sólido, através de um Planejamento Fatorial Completo 3². As fontes de nitrogênio utilizadas foram extrato de levedura, nitrato e uréia e os indutores óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho. As atividades emulsificantes O/A e A/O foram determinadas de acordo com a metodologia proposta por Martins et al. (2006). A uréia foi escolhida como a melhor fonte de nitrogênio e o óleo de soja foi o indutor que resultou nos melhores resultados de atividades emulsificantes.

Palavras-chave: Biossurfactantes, indutores, fonte de nitrogênio

1 INTRODUÇÃO

Os bioemulsificantes são compostos de origem biológica que apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica na molécula, o que confere a estas inúmeras propriedades surfactantes, são produzidos pelos microrganismos utilizando como substratos, compostos

como os óleos vegetais, carboidratos, resíduos industriais, petróleo e derivados. Os biossurfactantes são uma opção para substituírem os surfactantes sintéticos, pois são mais efetivos, atóxicos e biodegradáveis, podendo ser utilizados como emulsificantes, em diversos segmentos industriais, como alimentício, cosmético, detergentes, entre outros. Baseiam-se em propriedades funcionais importantes como emulsificação, separação, poder umectante, solubilização e redução de viscosidade (KIM et al., 2000).

O processo de fermentação em meio sólido utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água na composição, os quais devem atuar tanto como suporte fisiológico quanto como fonte de nutrientes na ausência de água livre. Esta fermentação apresenta como vantagens o baixo custo das matérias primas empregada no meio de cultivo, a simplicidade do meio de fermentação utilizada, a menor probabilidade de contaminação do meio pela menor quantidade de água presente e a possibilidade de obtenção da enzima extracelular mais concentrada. (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. Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes. O extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada para a produção de biossurfactantes, mas sua concentração varia de acordo com o microorganismo e o meio de produção (HOMMEL, R. K. et al. 1994). Objetivou-se o estudo de indutores e fontes de nitrogênio para a produção de biossurfactantes utilizando o microorganismo *Aspergillus fumigatus* via fermentação em estado sólido.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Microorganismo, manutenção e preparo do inóculo

O microorganismo *Aspergillus fumigatus* foi mantido em tubos com ágar batata-dextrose (PDA) inclinados sob refrigeração a 4 °C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo para a fermentação foi realizado através da inoculação do

Aspergillus fumigatus em erlenmeyers contendo 100 mL de meio PDA solidificado, inoculados com solução de esporos e incubados a 30 °C por 7 d.

2.1.2 Fermentação em estado sólido (FES)

O meio de cultivo para a fermentação em estado sólido foi preparado utilizando 85 % de farelo de soja e 15 % de casca de arroz. A esta matriz adicionou-se 70 % de solução salina, cuja composição era: KH_2PO_4 – 2 g/L; MgSO_4 – 1 g/L e solução traço – 10 mL/L. A composição da solução traço foi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,63 mg; MnSO_4 – 0,01mg; ZnSO_4 – 0,62 mg e água destilada até o volume de 1 L. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C e o pH ajustado para 4,5.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 250 mL contendo 25 g de meio, os quais foram adicionados 2 % de fontes de carbono e 2 % de fonte de nitrogênio conforme Planejamento Fatorial Completo – PFC 3^2 (Tabela 1). A inoculação dos meios foi realizada pela adição de 3 mL de solução de esporos de forma que a concentração inicial de inóculo fosse de $2 \cdot 10^6$ esporos/g meio. Posteriormente, os experimentos foram incubados a 30 °C sendo coletadas amostras nos tempos 0 d, 2 d, 4 d, 6 d, e 8 d para a realização das determinações analíticas.

Tabela 1: Matriz do Planejamento Fatorial Completo 3^2

Experimento	X ₁	X ₂
1	-1(Ur)	-1(AO)
2	0(EL)	-1(AO)
3	+1(Ni)	-1(AO)
4	-1(Ur)	0(OM)
5	0(EL)	0(OM)
6	+1(Ni)	0(OM)
7	-1(Ur)	+1(OS)
8	0(EL)	+1(OS)
9	+1(Ni)	+1(OS)

X₁= Fonte de Nitrogênio; X₂= Fonte de Carbono; Ur= Ureia; EL= Extrato de levedura;

Ni= Nitrato; AO= Azeite de oliva; OM= Óleo de milho; OS= Óleo de soja.

2.1.3 Determinações Analíticas

Os farelos fermentados da fermentação em estado sólido foram submetidos à extração para a determinação da atividade emulsificante. Para a extração, utilizou-se 5 g de farelo fermentado extraídos com 30 mL de água destilada a 90 °C seguido para o banho-maria a 50 °C durante 30 min, com posterior filtração em algodão e centrifugação a 6000 rpm por 15 min para a separação das células fúngicas e esporos, após, filtração em papel filtro. Os extratos obtidos foram utilizados para a determinação da atividade emulsificante.

As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo foram determinadas segundo metodologia proposta por MARTINS et al. (2006). Para 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. A absorbância da atividade emulsificante óleo em água foi obtida diminuindo-se a absorbância da amostra da absorbância do branco conforme a Equação 1.

A atividade emulsificante água em óleo foi realizada após 24 h de repouso, 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, sendo utilizado três brancos com água no lugar da amostra.

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

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

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.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no Planejamento Fatorial Completo (PFC) 3^2 , realizado para avaliar a influência das fontes de carbono e de nitrogênio sobre as AE O/A e A/O pelo fungo *Aspergillus fumigatus* via fermentação em estado sólido estão apresentados na Tabela 2. Foram apresentados os resultados dos tempos inicial (T0) e de 2 d de fermentação (T2), visto neste tempo terem sido observados os picos de atividades emulsificantes.

Tabela 2: AE água/óleo e óleo/água para os experimentos do PFC 3^2 em FES

Exp	X ₁ /X ₂	AE óleo/água (UE)*		AE água/óleo (UE)*	
		Tempo 0 d	Tempo 2 d	Tempo 0 d	Tempo 2 d
1	AO/Ni	2,570±0,505	2,248±0,733	6,494±0,246	36,538±52,482
2	AO/EL	2,545±0,393	4,167±0,484	8,215±3,331	6,535±0,077
3	AO/Ur	1,800±0,870	6,153±0,283	54,604±83,618	53,365±4,368
4	OS/Ni	2,702±0,157	2,813±0,082	6,646±0,031	6,358±0,220
5	OS/EL	3,000±0,234	3,507±0,438	14,101±0,523	6,648±0,076
6	OS/Ur	2,640±0,210	4,798±0,497	6,333±0,150	129,125±15,22
7	OM/Ni	2,147±0,129	3,845±0,245	6,305±0,058	79,345±125,95
8	OM/EL	2,332±0,040	4,525±0,696	13,916±2,653	38,958±12,719
9	OM/Ur	2,272±0,310	5,888±0,428	6,334±0,032	51,379±11,782

X₁= Fonte de Carbono; X₂= Fonte de Nitrogênio

*Resultados de média ± desvio padrão

As maiores atividades emulsificantes O/A (6,153 UE, 4,798 UE e 5,888 UE) foram obtidas no tempo de 2 d de fermentação, utilizando como fonte de nitrogênio a uréia. A maior AE A/O, de 129,125 UE (exp. 6) foi obtida com uréia e óleo de soja como indutor. Atividades emulsificantes A/O elevadas também foram obtidas nos experimentos 1 (azeite de oliva e nitrato), 7 (óleo de milho e nitrato) e 9 (óleo de milho e uréia).

A Tabela 3 apresenta a análise de variância dos resultados adimensionais da AE O/A, calculados através da divisão dos resultados obtidos em 2 d de fermentação em comparação com o tempo inicial, para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3^2 .

Tabela 3: Análise de variância dos resultados adimensionais da AE O/A em T2/T0 para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3^2

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{calculado}	F_{tabelado}
Regressão	4,971	4	1,243	16,679	3,179
Erro	0,969	13	0,075		
Total	5,939	17			

A análise de variância do modelo de regressão gerado para AE O/A do T2/T0 demonstrou que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao valor de F_{tabelado} . Segundo Muralidhar et al. (2001) o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser superior ao valor de F_{tabelado} para que a hipótese nula seja rejeitada ao nível de significância estudado, o que implica que a variação causada pelo modelo é significativamente maior que a variação não explicada.

A análise dos efeitos e dos coeficientes de regressão obtida a partir do Planejamento Fatorial Completo 3^2 está representada na Tabela 4.

Tabela 4: Efeitos estimados e coeficientes de regressão das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 3^2 sobre o adimensional da AE O/A no T2/T0

	Efeito	Coefficiente	p
	de regressão		
Média	1,658	1,218	0,000
FN linear	1,093	0,546	0,000
FN quadrático	-0,153	0,153	0,282
FC linear	0,297	0,149	0,082
FC quadrático	-0,507	0,507	0,003

FN = fonte de nitrogênio; FC = fonte de carbono

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta do adimensional da AE O/A em 2 d de fermentação, em função das variáveis fonte de nitrogênio e indutor. As maiores atividades emulsificantes foram obtidas utilizando uréia como fonte de nitrogênio óleo de milho ou azeite de oliva como indutores. A variável fonte de nitrogênio apresentou efeito linear positivo significativo ($p < 0,05$), ou seja, passando do nível inferior para o nível superior da

fonte de nitrogênio (de nitrato para uréia), foi observado aumento da AE O/A. O efeito quadrático da fonte de carbono também foi significativo ($p=0,003$) e negativo ($-0,507$), o que demonstra a presença de um ponto de mínimo de AE O/A utilizando o óleo de soja como indutor e nitrato como fonte de nitrogênio. O óleo de soja, entretanto, pode ser utilizado se a uréia for utilizada como fonte de nitrogênio.

A análise da variância dos resultados de AE A/O está apresentada na Tabela 5, sendo usadas como respostas as AE A/O adimensionais relacionando o tempo T2/T0, respectivamente.

Tabela 5: Análise de variância dos resultados adimensionais da AE A/O no T2/T0 para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3^2

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	555,644	4,000	138,911	9,203	3,179
Erro	196,219	13,000	15,094		
Total	751,863	17,000			

A análise da variância dos resultados adimensionais da AE água em óleo (A/O) demonstrou que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (9,203) foi superior ao valor de F_{tabelado} (3,179). Desta forma, o modelo estatístico foi validado. Os efeitos estimados e os coeficientes de regressão das variáveis sobre a resposta neste adimensional estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Efeitos estimados e coeficientes de regressão das variáveis FN e FC sobre o adimensional da AE A/O no T2/T0

	Efeito	Coefficiente	p
	de regressão		
Média	4,843	4,152	0,000
FN linear	11,206	5,603	0,000
FN quadrática	-5,217	5,217	0,019
FC linear	0,211	0,105	0,927
FC quadrática	4,181	-4,181	0,051

FN = fonte de nitrogênio; FC = fonte de carbono

A análise dos dados da Tabela 6 mostra que os efeitos lineares e quadráticos da fonte de nitrogênio foram significativos, no efeito quadrático na fonte de carbono ($p=0,051$) também houve significância ($p<0,05$) sobre a resposta na AE A/O no T2/T0 através do PFC 3^2 realizado para a fermentação em estado sólido.

O efeito linear da fonte de nitrogênio foi positivo indicando que a variação da fonte de nitrogênio dos níveis inferiores (nitrato) para os níveis superiores (uréia) ocasionaram aumento na AE A/O neste adimensional.

A Figura 2 apresenta a superfície de resposta da influência do indutor e da fonte de nitrogênio sobre o adimensional da AE A/O, demonstrando que a uréia foi a melhor fonte de nitrogênio, independente do indutor utilizado.

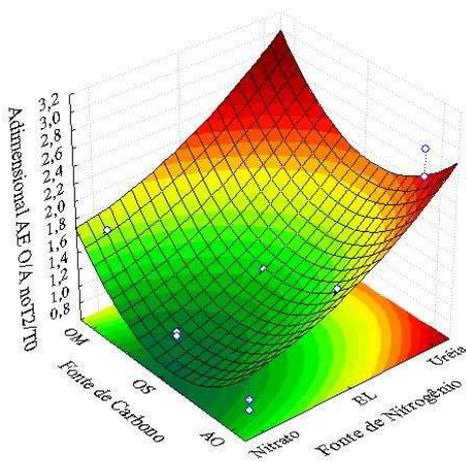


Figura 1: Superfície de resposta da influência das fontes de nitrogênio e indutores sobre o adimensional T2/T0 da AE O/A do Planejamento Fatorial Completo 3^2

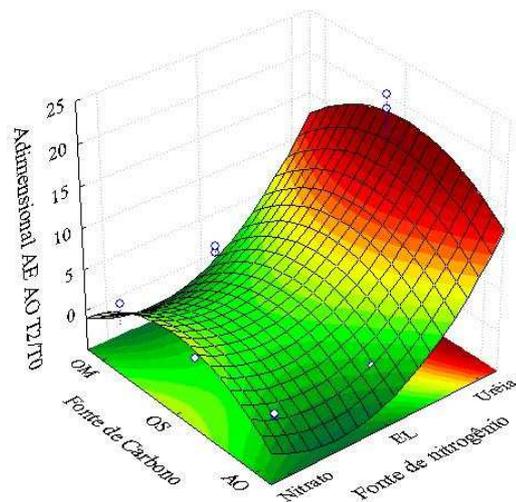


Figura 2: Superfície de resposta da influência das fontes de nitrogênio e fontes de carbono sobre o adimensional da AE A/O no T2/T0 no Planejamento Fatorial Completo 3^2

Os resultados adimensionais das atividades emulsificantes O/A e A/O obtidos através da relação entre as atividades emulsificantes obtidas em 2 d e no tempo inicial indicaram que a uréia e o óleo de soja devem ser utilizados como fontes de nitrogênio e indutor,

respectivamente, se o objetivo é a produção de biossurfactantes que apresentem elevadas AE A/O e O/A simultâneas.

Hommel e Huse (1993) mencionam que os biossurfactantes são predominantemente sintetizados por microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, mas também podem ser produzido por microrganismos que utilizam como fonte de carbono, glicose, sacarose, glicerol, etanol, entre outros. Vários são os estudos envolvendo a utilização de diferentes substratos na produção de biossurfactantes, mostrando que podem atuar como indutores, influenciando no tipo e no rendimento do biossurfactante.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser explicados pela afirmação de Levisauskas et al. (2004), que mencionam que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para taxa de crescimento celular são os principais fatores que influenciam a biossíntese de biossurfactante. Os resultados encontrados utilizando a uréia como fonte de nitrogênio e óleo de soja como fonte de carbono, nas condições utilizadas para síntese destes compostos por *Aspergillus fumigatus* foram vantajosas do ponto de vista econômico.

3 CONCLUSÃO

Na seleção de fontes de nitrogênio e indutores para a produção de bioemulsificantes via fermentação em estado sólido a partir do fungo *Aspergillus fumigatus*, a uréia e o óleo de soja foram os que apresentaram os melhores resultados simultâneos de atividades emulsificantes água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). Estas são, além disso, as fontes mais econômicas, dentre as estudadas, o que contribui para a diminuição dos custos de produção.

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.

HOMMEL, R. K.; HUSE, K.; Regulation of sophorose lipid production by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola*. *Biotechnol. Lett.*, v. 15, p. 853-858, 1993.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* on glucose. *J. Biotechnol.*, v.33, p. 147-155, 1994.

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.

LEVISAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; GRIGISKIS, S.; Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii* *Biotechnol. Lett.*, v.26, p. 1141-1146, 2004.

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

MURALIDHAR, R.; GUMMADI, S.N.; DASU, V.V.; PANDA, T. Statistical analysis on some critical parameters affecting the formation of protoplasts from the mycelium of *Penicillium griseofulvum*. *Biochem. Eng. J.*, v.16, p. 229-235, 2003.