

Área: Ciência de Alimentos

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

Laura Tochetto, Éllen Francine Rodrigues, 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 compostos de origem biológica produzidos pelos microrganismos utilizando como substratos compostos como os óleos vegetais, carboidratos, resíduos industriais, petróleo e derivados. A concentração de bioemulsificantes produzidos por microrganismos em meios de cultivo é influenciada pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas. Objetivou-se selecionar indutores e nitrogênio para a produção de bioemulsificantes via fermentação submersa através do fungo *Aspergillus fumigatus*. Para tanto um Planejamento Fatorial Completo 3^2 utilizando como variáveis a fonte de nitrogênio (uréia, extrato de levedura ou nitrato) e o indutor (azeite de oliva, óleo de milho ou óleo de soja) foi utilizado. O meio de cultivo utilizado para as fermentações foi preparado a partir de um extrato aquoso de farelo de soja, adicionado de solução de micronutrientes, de 2% da fonte de nitrogênio e indutor e pH final de 7,0. As fermentações foram conduzidas por 8 d a 30°C, sendo retiradas alíquotas para a determinação das atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo, determinadas conforme Martins et al. (2006). As maiores atividades emulsificantes foram obtidas com o nitrato de sódio e o óleo de soja como fontes de nitrogênio e indutor, respectivamente.

Palavras-chave: nitrato de sódio, óleo de soja, atividade emulsificante

1 INTRODUÇÃO

Os bioemulsificantes são compostos de origem biológica produzidos pelos microrganismos, utilizando como substratos, compostos como os óleos vegetais, carboidratos, resíduos industriais, petróleo e derivados (KIM et al., 2000). São moléculas anfifílicas que

atuam na interface das emulsões e em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH. (ALONSO, 2001). São estruturados por uma porção hidrofílica que consiste de aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions; mono, dissacarídeos ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica consistindo de ácidos graxos saturados ou insaturados, e por isso ficam acumulados na interface formando micelas, mediando as fases de diferentes polaridades como óleo-água, ar-água ou água-sólido. (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

A produção de bioemulsificantes sofre influência por fatores como a natureza da fonte de carbono e nitrogênio, limitações nutricionais, temperatura, aeração e o tipo de microrganismo utilizado (BANAT, 1997). Pode ser produzido a partir da fermentação submersa, que possui como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, pois garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, se monitorados por sensores adequados. No entanto, a maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente deste processo (ALONSO, 2001)

A natureza de fontes de nitrogênio e indutores são essenciais para o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas. Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de bioemulsificantes, tais como uréia, eptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de sódio. A produção de biosurfactantes é realizada a partir de diferentes fontes de indutores, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão (HOMMEL et al. 1994).

Objetivo-se a seleção de fontes indutores e nitrogênio para a produção de bioemulsificantes via fermentação submersa por *Aspergillus fumigatus*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo *Aspergillus fumigatus* 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 a fermentação foi realizado através da inoculação do fungo em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado sendo incubados a 30 °C por 7 d.

2.1.2 Preparo do meio para Fermentação Submersa (FS)

O meio de cultivo foi preparado a partir da cocção de 10 % de farelo de soja em água destilada, a 100 °C durante 30 min, seguindo-se de filtração em tecido para remoção de sólidos. Ao meio filtrado adicionou-se 10 % de solução salina contendo micronutrientes. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C e o pH ajustado para 7,0.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio inicial, 2 % de fontes de carbono e 2 % de fonte de nitrogênio conforme Planejamento Fatorial Completo – PFC 3² (Tabela 1), e inoculados com uma área circular de 2 cm de diâmetro do ABD contendo esporos fúngicos.

Tabela 1: Matriz do Planejamento Fatorial Completo 3²

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.

Os erlenmeyers da fermentação foram incubados por 8 d a 30 °C, com agitação em agitador orbital de 150 rpm, retirando a amostra a cada 48 h nos tempos 0 d, 2 d, 4 d, 6 d, e 8 d para determinação da atividade emulsificante óleo em água e água em óleo.

2.1.3 Obtenção dos extratos para determinação da atividade emulsificante

Para determinação das atividades emulsificantes, os meios fermentados foram centrifugados por 20 min a 6000 rpm.

2.1.4 Determinação da atividade emulsificante

As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo foram determinadas segundo metodologia proposta por Martins et al. (2006). A determinação da atividade emulsificante óleo em água foi realizado em tubos, 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 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, sendo utilizado três brancos com água no lugar da amostra.

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

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

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.

2.1.5 Tratamento dos dados e análise estatística

Para obter uma relação da variação entre a produção de bioemulsificantes no início da fermentação e nos demais tempos, utilizou-se para a análise estatística dos planejamentos experimentais os adimensionais entre os tempos que apresentaram as maiores atividades emulsificantes e o tempo inicial da fermentação, conforme a Equação 3 .

$$ADM = T_x/T_0 \quad (3)$$

Sendo:

ADM= adimensional

T_x= tempo de maior atividade emulsificante

T₀= tempo inicial da fermentação

Os resultados adimensionais foram analisados através de Análise de Variância

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no Planejamento Fatorial Completo 3² realizado para avaliar o efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a atividade emulsificante óleo em água e água em óleo utilizando fungo *Aspergillus fumigatus* na fermentação submersa estão apresentados Tabela 2. Para a atividade emulsificante óleo em água foram apresentados os resultados dos tempos 6 d (T₆) e inicial (T₀), enquanto que para a atividade emulsificante água em óleo foram mostrados os resultados dos tempos 2 d e inicial (T₀), visto que nestes tempos 6 d e 2 d foram observadas as máximas atividades emulsificantes.

As maiores atividade emulsificante água em óleo foram encontradas em 2 d de FS com óleo de milho e nitrato de sódio (5,170±1,679UE) ou extrato de levedura utilizando óleo de soja (3,977±0,081UE). As maiores atividade emulsificante água em óleo foram obtidas em 2 d de fermentação com nitrato de sódio combinado com óleo de soja (223,580±23,421UE) ou azeite de oliva (213,019±27,877UE).

Tabela 2: Atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo para o PFC 3² em FS

Experimento	X ₁ /X ₂	AE óleo/água*		AE água/óleo*	
		T0	T6	T0	T2
1	AO/Ni	2,880±0,538	1,030±0,792	120,108±55,691	213,019±27,877
2	AO/EL	3,282±0,536	3,555±0,323	121,352±14,608	52,802±40,812
3	AO/Ur	2,168±0,511	0,292±0,328	121,352±48,496	3,623±4,587
4	OS/Ni	3,340±0,830	3,678±1,048	167,705±7,118	223,580±23,421
5	OS/EL	3,407±1,020	3,977±0,081	146,479±15,158	47,525±70,920
6	OS/Ur	4,673±0,267	2,615±1,336	182,136±7,734	154,270±11,891
7	OM/Ni	4,185±1,102	5,170±1,679	194,678±5,226	154,329±83,485
8	OM/EL	3,378±1,019	3,342±1,459	197,004±12,809	5,889±0,054
9	OM/Ur	3,357±1,261	0,870±0,528	171,344±18,575	5,962±0,145

X₁= Fonte de Carbono; X₂= Fonte de Nitrogênio

*Resultados média ± desvio padrão

A Tabela 3 apresenta a análise de variância do adimensional da atividade emulsificante água em óleo considerando-se o tempo 2 e tempo inicial no Planejamento Fatorial Completo 3² para a fermentação submersa.

Tabela 3: Análise de variância dos resultados adimensionais T2/T0 da atividade emulsificante água em óleo para as variáveis do Planejamento Fatorial Completo 3²

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	de Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3,875	4,000	0,969	24,879	3,179
Erro	0,506	13,000	0,039		
Total	4,381	17,000			

Verifica-se que o valor de F_{calculado} foi superior ao F_{tabelado}, validando o modelo. A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados e os coeficientes de regressão das variáveis sobre o adimensional T6/T0 da atividade emulsificante óleo em água.

Tabela 4: Efeitos estimados e coeficientes de regressão das variáveis FN e FC sobre o adimensional da atividade emulsificante óleo em água no T6/T0

	Efeito	Coeficiente	p
	de regressão		
Média	0,855	1,533	0,000
FN linear	-0,677	-0,339	0,000
FN quadrático	0,648	-0,648	0,000
FC linear	0,302	0,151	0,020
FC quadrático	0,369	-0,369	0,002

FN = fonte de nitrogênio; FC = fonte de carbono

A partir da análise dos dados da Tabela 4, verifica-se que os efeitos lineares e quadráticos das fontes de carbono e nitrogênio foram significativos sobre a atividade emulsificante óleo em água no Planejamento Fatorial Completo 3^2 realizado para a fermentação submersa.

O efeito linear da fonte de nitrogênio foi negativo indicando que a variação da fonte de nitrogênio dos níveis inferiores (nitrato) para os níveis superiores (uréia) ocasionaram diminuição na atividade emulsificante óleo em água. O efeito linear da fonte de carbono foi positivo, indicando que a variação da fonte de carbono dos níveis inferiores (azeite de oliva) para os superiores (óleo de milho) aumentou a atividade emulsificante óleo em água. Os efeitos quadráticos positivos indicam ponto de máximo no modelo estatístico.

A Tabela 5 apresenta a análise de variância do adimensional T2/T0 das atividades emulsificante água em óleo obtidas em função das variáveis FN e FC do Planejamento Fatorial Completo 3^2 da fermentação submersa.

Tabela 5: Análise de variância do adimensional T2/T0 das atividades emulsificante água em óleo para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3^2

	Soma	de Graus	de Quadrado		
	quadrados	liberdade	Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	3,791	4,000	0,948	12,203	3,179
Erro	1,010	13,000	0,078		
Total	4,801	17,000			

Verificou-se na Tabela 5 que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao F_{tabelado} , validando o modelo estatístico. A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados e os coeficientes de regressão do adimensional T2/T0 da atividade emulsificante água em óleo, verificando-se que somente os efeitos lineares e quadráticos da fonte de nitrogênio foram significativos ($p < 0,05$) sobre a resposta. O efeito linear da fonte de nitrogênio foi negativo sobre o adimensional entre o tempo 2 e o tempo inicial da atividades emulsificante água em óleo, indicando que menores respostas foram obtidas nos níveis superiores destas variáveis.

Tabela 6: Efeitos estimados e coeficientes de regressão do Planejamento Fatorial completo 3^2 sobre o adimensional da atividades emulsificante água em óleo no T2/T0

	Efeito	Coeficiente de Regressão	p
Média	0,547	0,391	0,020
FN linear	-0,896	-0,448	0,000
FN quadrático	-0,491	0,491	0,004
FC linear	-0,280	-0,140	0,106
FC quadrático	0,215	-0,215	0,146

FN = fonte de nitrogênio; FC = fonte de carbono

As maiores atividades emulsificantes óleo em água foram obtidas com extrato de levedura como fonte de nitrogênio e óleo de soja como fonte de carbono (Figura 1), enquanto que as maiores atividades emulsificantes água em óleo foram obtidas com qualquer fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (Figura 2).

Em experimentos conduzidos por Zinjarde e Pant (2002), a produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica*, avaliada frente a diferentes fontes de nitrogênio, o sulfato de amônio e cloreto de amônio propiciaram maior atividade de emulsificação, enquanto que não foi detectada atividade de emulsificação quando o nitrato de sódio foi utilizado. Isso demonstra haver a necessidade de mais estudos de fontes de nitrogênio e carbono, bem como de suas concentrações, a fim de otimizar a produção de biossurfactantes.

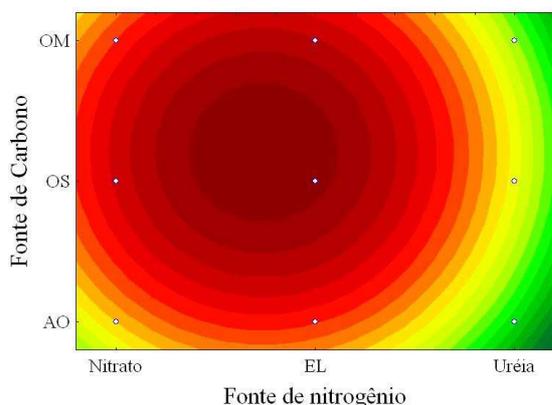


Figura 1: Influência das fontes de nitrogênio e fontes de carbono sobre o adimensional T6/T0 da atividade emulsificante óleo em água para os experimentos do PFC 3²

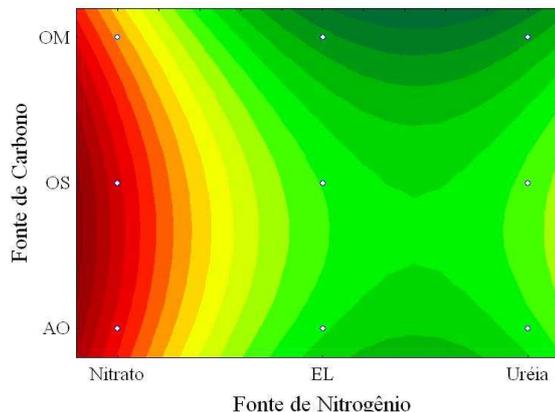


Figura 2: Influência das fontes de nitrogênio e fontes de carbono sobre o adimensional T2/T0 da atividade emulsificante água em óleo para os experimentos do PFC 3²

Apesar das maiores atividades emulsificantes óleo em água obtidas utilizando o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, os elevados custos desta fonte são um impeditivo à sua utilização. Este melhor resultado pode estar associado ao fato do extrato de levedura constituir-se de uma fonte de nitrogênio complexa, que possui ainda outros nutrientes, como vitaminas do complexo B. Em virtude do nitrato de sódio ter se apresentado como a melhor fonte de nitrogênio para a obtenção de elevadas atividades emulsificantes água em óleo, esta pode ser escolhida em detrimento do extrato de levedura. Além disso, se observados os valores adimensionais obtidos para a atividade emulsificante óleo em água, verifica-se que estes eram inferiores à unidade, ou seja, a atividade emulsificante óleo em água da maior parte dos extratos do planejamento era superior no tempo inicial. Em relação ao indutor, o óleo de soja possibilitou os melhores resultados de atividades emulsificantes, além de ser uma opção mais econômica que o óleo de milho e azeite de oliva.

Makkar e Cameotra (2002) menciona que a otimização do processo fermentativo é o fator chave para melhorar o rendimento da produção e diminuir os custos. Vários são os estudos voltados à influência das fontes de carbono e nitrogênio, mostrando que são parâmetros importantes na produção de biossurfactantes, uma vez que o tipo e a concentração do substrato empregado pode aumentar ou reduzir a síntese do biossurfactante e, até mesmo modificá-lo estruturalmente.

3 CONCLUSÃO

O nitrato de sódio foi selecionado como a melhor fonte de nitrogênio, pois além de apresentar elevada atividade emulsificante óleo em água e água em óleo, é também uma fonte de nitrogênio mais econômica comparado ao extrato de levedura.

O óleo de soja possibilitou os melhores resultados de atividades emulsificantes, sendo selecionado como a melhor fonte de carbono

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.
- 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.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant productions and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 428-434, 2002.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 329, p. 291-297, 2004.
- ZINJARDE, S.S.; PANT, A.; Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J. Basic Microbiol.*, v. 42, n.1, p. 67-73.