

Área: Engenharia de Alimentos

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Corynebacterium aquaticum* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Paola Chaves Martins*, Helen Arruda Rodrigues, Vilásia Guimarães Martins

Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

**E-mail: paolachavesmartins@gmail.com*

RESUMO – Este estudo tem como objetivo a produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum* utilizando como substrato resíduo de pescado, lodo de petróleo e glicerol. Para o desenvolvimento do bioproduto o meio de cultivo foi constituído de meio mineral, 2% do micro-organismo e o substrato foi adicionado nas concentrações de 3, 5 e 7% dos resíduos, separadamente. As determinações da produção de biossurfactantes foram realizadas nos tempo 0, 24, 48 e 72 h de cultivo. As análises realizadas foram de tensão superficial e atividade emulsificante. O cultivo utilizando pescado como fonte de carbono apresentou os melhores resultados, sendo verificado uma tensão superficial em torno de 27 mN/m e atividade emulsificante de aproximadamente 35% em 48 h de cultivo utilizando 3% de substrato. Para os cultivos desenvolvidos utilizando lodo de petróleo e glicerol, as tensões superficiais se mantiveram baixas desde o início do processo não apresentando uma redução ao longo do cultivo, em relação à atividade emulsificante, esta apresentou valores próximos a 30% tendendo a diminuir ao longo do período de cultivo. Dessa forma, foi possível concluir que nas condições de processo utilizadas, os resíduos de lodo e glicerol não se apresentaram como fontes de carbono adequadas para a produção do bioproduto esperado. No entanto, o resíduo de pescado e as condições de cultivo utilizadas foram capazes de produzir biossurfactantes que conseguiram reduzir a tensão superficial até 26,2%.

Palavras-chave: Atividade emulsificante, glicerol, lodo, resíduo de pescado, tensão superficial.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e/ou interfacial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes. Os biossurfactantes são subprodutos metabólicos de bactérias e fungos. Estes apresentam inúmeras aplicações, em

uma variada gama de setores industriais. Os biossurfactantes podem ser utilizados em processos de biorremediação (água e solo), recuperação melhorada do petróleo, limpeza de reservatórios de petróleo, indústrias de alimentos (emulsificantes, dispersantes e solubilizantes), sequestrante de metais, remoção e solubilização de tintas, entre outros (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Um dos principais problemas na produção de biossurfactantes é o custo envolvido neste processo. Porém, isto pode ser significativamente reduzido através da utilização de fontes alternativas de nutrientes, os quais sejam facilmente disponíveis e de baixo custo. O uso de resíduos industriais como fonte de energia, para a produção de biossurfactantes, é uma alternativa atraente para baixar o custo de produção, tornando o processamento viável (AL-BAHRY et al., 2013). No entanto, a seleção de substratos residuais envolve a dificuldade de encontrar um resíduo com equilíbrio certo de nutrientes, suficiente para propiciar um crescimento ótimo e produção de metabólitos. Resíduos agroindustriais com alto teor de carboidratos ou lipídios são atrativos para a utilização neste processo, pois geralmente apresentam os nutrientes necessários para serem utilizados como substrato (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Assim, este estudo tem como objetivo a produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum* utilizando três tipos de resíduos industriais, resíduo de pescado, lodo remanescente de tanques de armazenamento de petróleo e glicerol bruto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A matéria-prima utilizada como fonte de carbono para o cultivo foi, resíduo de pescado, glicerol bruto e lodo de tanques de armazenamento de petróleo. O micro-organismo utilizado no cultivo foi a *Corynebacterium aquaticum*, fornecido pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica - FURG

2.2 Produção de Biossurfactantes

O cultivo aeróbio foi realizado em fermentadores de bancada de 500 mL com volume útil de 400 mL, a 30 °C, agitação orbital de 200 rpm por 72 h. O meio foi constituído por fontes de carbono variadas e meio mineral. O meio mineral foi formulado como o descrito por Cooper e Goldenberg (1987), constituído de (g/L), 4 g NH₄NO₃; 4,0822 g KH₂PO₄; 0,0008 g CaCl₂; 10,7182 g Na₂HPO₄; 0,1971 g MgSO₄; 0,0011 g FeSO₄ e 0,0015 g EDTA. As fontes de carbono utilizadas tiveram suas concentrações variadas (3, 5 e 7%). Após a formulação do meio de cultivo este foi esterilizado. A adição do micro-organismo foi realizada como descrito por Makkar e Cameotra (1998), a superfície do erlenmeyer que contém o micro-organismo foi raspada e diluída com o auxílio do meio mineral até atingir a densidade óptica de 0,8 – 0,9, em comprimento de onda de 600 nm. As suspensões foram adicionadas na proporção de 2% (v/v).

As análises para a verificação da produção do bioproduto foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h de cultivo. Conforme as amostras foram retiradas do reator, estas foram centrifugadas por 30 min a 19000 g para a retirada das células e de resíduos sólidos.

2.3 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante água em óleo ($AE_{w/o}$) do meio foi analisada de acordo com o método descrito por Broderick e Cooney (1982). A atividade emulsificante consiste na diferença de altura total de líquido no tubo e a altura final obtida de óleo.

2.4 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi avaliada no próprio meio de cultivo, sendo obtida por meio da utilização do tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados de tensão superficial obtidos utilizando os diferentes tipos de resíduos para a produção de biossurfactantes durante um período de 72 h.

Tabela 1 – Tensão superficial obtida pelos biossurfactantes produzidos em diferentes concentrações de pescado.

Substrato	Tensão superficial (mN/m)			
	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
3% Pescado	37,4 ^{a,A} ± 0,4	31,4 ^{c,B} ± 0,3	27,6 ^{d,B} ± 0,3	34,7 ^{b,A} ± 0,3
5% Pescado	37,0 ^{a,A} ± 0,4	31,3 ^{b,B} ± 0,2	28,1 ^{d,B} ± 0,5	29,8 ^{c,B} ± 0,6
7% Pescado	36,5 ^{a,A} ± 0,4	33,2 ^{b,A} ± 0,2	29,4 ^{c,A} ± 0,2	29,1 ^{c,B} ± 0,2

Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa. Ambas ao nível de 95% de confiança.

Tabela 2 - Tensão superficial obtida pelos biossurfactantes produzidos em diferentes concentrações de lodo.

Substrato	Tensão superficial (mN/m)			
	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
3% Lodo	35,4 ^{a,B} ± 0,5	33,4 ^{b,B} ± 0,2	33,4 ^{b,B} ± 0,2	36,5 ^{a,B} ± 0,4
5% Lodo	34,6 ^{b,B} ± 0,4	34,4 ^{b,A} ± 0,2	34,0 ^{b,A} ± 0,1	38,3 ^{a,A} ± 0,1
7% Lodo	36,6 ^{b,A} ± 0,1	34,4 ^{c,A} ± 0,4	33,3 ^{d,B} ± 0,3	37,3 ^{a,B} ± 0,1

Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa. Ambas ao nível de 95% de confiança.

Tabela 3 - Tensão superficial obtida pelos biossurfactantes produzidos em diferentes concentrações de glicerol.

Substrato	Tensão superficial (mN/m)			
	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
3% Glicerol	28,4 ^{c,A} ± 0,1	29,2 ^{b,A} ± 0,2	27,8 ^{d,A} ± 0,4	31,6 ^{a,A} ± 0,6
5% Glicerol	28,5 ^{b,A} ± 0,3	27,8 ^{c,B} ± 0,4	27,8 ^{c,A} ± 0,4	30,2 ^{a,B} ± 0,5
7% Glicerol	27,8 ^{b,c,B} ± 0,2	27,6 ^{c,B} ± 0,3	28,3 ^{b,A} ± 0,3	29,7 ^{a,B} ± 0,5

Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa. Ambas ao nível de 95% de confiança.

Através da Tabela 1 foi possível verificar que os biossurfactantes produzidos a partir das diferentes concentrações de pescado diminuíram a tensão superficial. No entanto, os biossurfactantes produzidos com as concentrações de 3 e 5% foram capazes de promover as menores tensões superficiais em torno de 28 mN/m. Os biossurfactantes produzidos apresentaram menor tensão superficial no tempo de 48 h de cultivo, sendo que a partir deste tempo apresentaram uma tendência a aumentarem os valores da tensão superficial, provavelmente pela produção de compostos secundários.

Segundo Aguiar (2013) ao estudar a produção de biossurfactantes através de *Corynebacterium aquaticum* utilizando resíduo de corvina na proporção de 2,5%, no tempo de 48 h este obteve um valor de 30,5 mN/m. Neste estudo, o valor obtido para a tensão no tempo de 48 h utilizando 3, 5 e 7% de resíduo de pescado foi de 27,6, 28,1, 29,4 mN/m, respectivamente. Dessa forma, foi possível verificar que neste estudo os valores de tensão superficial obtidos foram menores que o descrito pelo autor citado. Sendo assim, o uso de uma maior concentração de substrato propiciou a diminuição da tensão superficial.

Ao verificar a Tabela 2 se observou que a produção de biossurfactantes utilizando lodo como fonte de carbono nas diferentes concentrações apresentou-se insatisfatória. Embora utilizando as concentrações de 3 e 5% de lodo a tensão superficial tenha apresentado uma pequena diminuição nos tempos de 0 até 48 h, ao longo do cultivo e de outras concentrações do substrato as tensões superficiais não apresentaram uma correlação. O que indica que o micro-organismo talvez não tenha conseguido utilizar essa fonte de carbono para a produção de biossurfactante. De acordo com Fontes et al. (2008) para que seja possível obter uma alta produção de biossurfactante é de suma importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo. Além disto, segundo Bannat et al (2000) diversos fatores podem afetar a produção de biossurfactante como, o tipo de fonte de carbono utilizada e a presença de minerais.

Segundo a Tabela 3 foi possível observar que as tensões superficiais obtidas nas diferentes concentrações durante todo o período de cultivo variou apenas 4 mN/m. O comportamento verificado para a tensão superficial foi incomum uma vez que o tempo 0 apresentou tensões menores do que ao decorrer do tempo de cultivo, evidenciando que possivelmente o biossurfactante não foi produzido. Silva et al. (2010) verificou a produção de biossurfactante através de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 utilizando glicerol como fonte de carbono. O autor obteve resultados de tensão superficial de aproximadamente 27 mN/m. Além disto, o autor afirma que o glicerol pode ser usado para o crescimento microbiológico e para a produção de diversos bioprodutos. As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores de atividade emulsificante obtidos durante as 72 h de

cultivo para as diferentes concentrações de resíduo de pescado e de glicerol. Para o resíduo de petróleo a atividade emulsificante não apresentou resultados positivos em nenhum dos dias do cultivo.

Tabela 4 – Atividade emulsificante obtida pelos biossurfactantes produzidos em diferentes concentrações de pescado.

Substrato	Atividade emulsificante (%)			
	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
3% Pescado	33,3 ^{a,A} ± 2,0	31,4 ^{a,A} ± 2,2	34,8 ^{a,A} ± 1,2	27,1 ^{b,B} ± 1,1
5% Pescado	32,5 ^{a,A} ± 1,8	28,4 ^{b,AB} ± 1,2	32,8 ^{a,A} ± 2,4	30,7 ^{ab,A} ± 1,9
7% Pescado	35,1 ^{a,A} ± 1,5	26,7 ^{c,b,B} ± 2,0	27,8 ^{b,B} ± 1,7	30,1 ^{b,A} ± 2,4

Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa. Ambas ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5 - Atividade emulsificante obtida pelos biossurfactantes produzidos em diferentes concentrações de glicerol.

Substrato	Atividade emulsificante (%)			
	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
3% Glicerol	31,5 ^{a,A} ± 1,9	32,0 ^{a,A} ± 1,0	27,4 ^{b,A} ± 1,3	-
5% Glicerol	30,5 ^{a,A} ± 2,6	27,4 ^{b,B} ± 1,0	20,5 ^{c,A} ± 2,4	-
7% Glicerol	31,4 ^{a,A} ± 1,2	26,0 ^{b,B} ± 1,1	-	-

Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa; Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa. Ambas ao nível de 95% de confiança.

Através da Tabela 4 foi possível verificar que a atividade emulsificante obtida foi em torno de 33%. Ao longo dos cultivos não foi verificado um aumento da atividade emulsificante. Embora tenha sido verificada a produção dos biossurfactantes através da verificação da tensão superficial, esta produção de bioproducto não conferiu um aumento da capacidade de emulsificação do óleo de soja. Aguiar (2013) verificou a atividade emulsificante utilizando 2,5% de resíduo de corvina e o mesmo micro-organismo deste estudo e obteve 42,5% de atividade emulsificante no tempo de 72 h de cultivo. Este estudo apresentou valores inferiores aos reportados pelo autor. No entanto, é preciso levar em consideração que neste estudo o resíduo utilizado foi o total da indústria pesqueira, o qual contém maiores valores de lipídeos e compostos insolúveis, como escamas e barbatanas, o que dificulta o uso destes componentes pelo micro-organismo.

As atividades emulsificantes obtidas usando glicerol como fonte de carbono (Tabela 5) apresentou como maior percentual de atividade emulsificante 32%. No entanto, apresentou altos valores no tempo 0 os quais decaíram ao longo do cultivo chegando a serem nulos no tempo de 72 h.

De acordo como Chen et al. (2007) existem biossurfactantes que podem estabilizar (emulsificantes) e outros que podem desestabilizar (desemulsificantes) as emulsões. Acredita-se que os biossurfactantes obtidos a partir de resíduo de pescado como fonte de substrato, apresentem a característica de estabilizar emulsões, uma vez que foi verificado que a atividade emulsificante praticamente não apresentou variações.

4 CONCLUSÃO

Após o exposto, foi possível verificar que dentre todos os resíduos utilizados como fonte de carbono para a produção do bioproduto, o resíduo de pescado foi o que apresentou os melhores resultados. Sendo possível encontrar valores de tensão em torno de 27 mN/m. Valores abaixo de 30 mN/m são considerados promissores, uma vez, que um dos biossurfactante mais estudados, a Surfactina, tem capacidade de redução da tensão da água de 72 para 27 mN/m.

5 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. P. S. Produção de biossurfactante e co-produção de lipase a partir de resíduos agroindustriais. **Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos** - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E. A. S.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbialsurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BRODERICK L. S.; COONEY J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from fresh water ecosystems. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 23, p. 425-434, 1982.
- CHEN, C., BAKER, S. C., DARTON, R. C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of microbiological methods**, v, 70, p. 503-510, 2007.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**. v.31, n.8, p.2091-2099, 2008 .
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.