

Produção de biossurfactantes a partir de diferentes resíduos agroindustriais

RESUMO

Gean Pablo Silva Aguiarg.pablo@hotmail.com

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Vilásia Guimarães Martinsvilasiamartins@furg.br

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0003-1374-8053>**Paola Chaves Martins**pah_chaves@hotmail.com

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Raphael Aparecido Boscheror.boschero@yahoo.com.br

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Carlos Prentice-Hernándezdamprent@furg.br

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Biossurfactantes são substâncias tensoativas com inúmeras aplicações. A produção de biossurfactantes a partir de 5, 10 e 15% de soro de queijo foi realizada por *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum* na concentração de 2% e meio mineral mínimo. O cultivo foi realizado a 200 rpm, 30 °C por 48 h. Para os resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) foram realizados 2 planejamentos experimentais fatoriais 3², onde foram avaliadas a influência dos micro-organismos (2%) e a concentração de pescado 0,83, 1,66 e 2,50%. Um dos planejamentos foi realizado em biorreatores com chicanas e sem chicanas. As condições de cultivo foram, agitação de 200 rpm, 30 °C por 72 h. Os cultivos que utilizaram o soro de queijo como substrato obtiveram baixa redução da tensão superficial. Nos cultivos com resíduos de pescado houve redução da tensão superficial para valores próximos de 24 mN.m⁻¹ nos biorreatores com chicanas e 27 mN.m⁻¹ para os sem chicanas. O melhor resultado foi obtido nos biorreatores com chicanas onde foi utilizada a concentração de 0,83% de pescado e o micro-organismo *Corynebacterium aquaticum*, obtendo 23,74 mN.m⁻¹ de tensão superficial, sendo o valor obtido menor do que valor do biossurfactante mais referenciado na literatura, a *Surfactina*, que possui tensão de 27 mN.m⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade emulsificante; Resíduos de corvina; Soro de queijo; Tensão superficial.

INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos constituídos por moléculas que contêm porções hidrofóbicas e hidrofílicas que, através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, reduzem as tensões superficial e interfacial, conseqüentemente ocorre um aumento da área superficial de compostos insolúveis, permitindo o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação. Os surfactantes biológicos possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BANAT et al. 2000), com possibilidade de produção a partir de fontes renováveis (MANI et al., 2016). Sobre estes também podemos dizer que apresentam as mesmas propriedades dos surfactantes químicos, tais como, capacidade de emulsificação, agente molhante, lubrificante, dispersante e solubilizante de fases (DESAI e BANAT, 1997), sendo sua aceitabilidade ecológica a vantagem mais importante sobre os surfactantes químicos (HABA et al., 2000).

Segundo BARROS et al. (2007) e PACWA-PŁOCINICZAK et al. (2011) o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo. Podemos assim utilizar os co-produtos provenientes das indústrias de alimentos como meio de cultura para micro-organismos produtores de biossurfactantes, visto que os resíduos gerados pela indústria de alimentos são hoje considerados uma fonte barata de componentes valiosos quando utilizados tecnologias de aproveitamento do mesmo (GALANAKIS, 2012; RAVINDRAN et al., 2016), sabe que a produção de resíduos agroindustrial abrange todo o ciclo de vida do alimentos: desde a agricultura, fabricação e processamento industrial, varejo e consumo doméstico (MIRABELLA et al., 2014) deste modo há bastante material para utilização como fonte alternativa de nutrientes.

A corvina é uma das espécies de pescado de maior captura do litoral do Atlântico Sul, representando em torno de 24,02% do desembarque total de pescado no Estado de Rio Grande do Sul, ao que podemos perceber que há grande geração de resíduos deste pescado, já que do processamento do mesmo cerca de 64% é considerado resíduo (BRASIL, 2005).

O soro de queijo apresenta uma produção mundial estimada em valores acima de 80×10^9 L/ano. No Brasil, a produção está estimada em torno de 450.000 T/ano (RICHARDS, 2002). Porém, o soro do leite é pouco aproveitado no setor tecnológico alimentício, apesar do fato de que sua produção pode chegar até nove vezes à quantidade de matéria comercial produzida (queijo, iogurte, entre outros). Portanto, o soro tem contribuição significativa no efluente final da indústria de laticínios tanto em termos quantitativos, quanto qualitativos (MAGANHA, 2006).

Por fim, visando tanto o aspecto ambiental como o econômico, o objetivo do trabalho foi utilizar o soro de queijo e resíduos de pescado como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA DAS AMOSTRAS

As matérias-primas utilizadas para produção dos biossurfactantes foram: soro de queijo e resíduos de pescado. O soro de queijo foi proveniente da indústria de laticínios Pomerano, localizada na cidade de São Lourenço do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O soro utilizado foi coletado do processo de queijo prato, neste havia água da lavagem do queijo misturada com soro proveniente do processo. O resíduo em questão foi coletado em frascos plásticos e armazenado na planta de processamento do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (FURG), e congelado a -20 °C, para uso posterior.

A corvina (*Micropogonias furnieri*) foi adquirida no mercado público da cidade de Rio Grande, RS, e levado em caixas de isopor com gelo até a planta de processamento do Laboratório de Tecnologia de Alimentos – FURG, local onde foi executada a filetagem da corvina. O resíduo então foi constituído de cabeça, vísceras, pele, ossos, escamas, entre outros. Com a finalidade de obter uma homogeneização destes resíduos, os mesmos passaram por uma despoldadeira. Para o processo fermentativo os resíduos foram diluídos em água destilada esterilizada na proporção de 1:5 (pescado:água).

Os resíduos agroindustriais em questão foram utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para a produção de surfactante biológico.

CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Para determinar a composição proximal dos resíduos foram realizadas análises de proteína, lipídios, umidade e cinzas, de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995), e os carboidratos foram determinados por diferença. A quantificação de lactose do soro de queijo foi realizada segundo metodologia de Gonçalves (2009).

PROPAGAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Para a produção dos biossurfactantes foram utilizadas, as bactérias, *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*. Estes foram mantidos e propagados em meio Plate Count Agar. O crescimento dos micro-organismos ocorreu em frascos de Roux a 35 °C por um período de 48 h. Posteriormente ao processo de propagação, os micro-organismos foram mantidos refrigerados a 4 °C até sua utilização.

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DO SORO DE QUEIJO

A produção de biossurfactantes a partir de soro de queijo foi realizado por cultivo submerso por 48 h, em Erlenmeyers de 500 mL a 200 rpm e 30 °C. O meio de cultivo foi composto por: meio mineral mínimo e uma fonte de carbono (soro de queijo). A composição do meio mineral foi: 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 em 1 L de água destilada (COOPER et al., 1987). Nesta etapa foram utilizadas concentrações de 5%, 10% e 15% de soro de queijo, os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*, na concentração de 2% e o pH inicial do meio foi 7,0 (Tabela 1).

Tabela 1. Ensaio realizados para soro de queijo.

Ensaio	Soro de queijo (%)	Micro-organismo
1	5	<i>Bacillus subtilis</i>
2	10	<i>Bacillus subtilis</i>
3	15	<i>Bacillus subtilis</i>
4	5	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
5	10	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
6	15	<i>Corynebacterium aquaticum</i>

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE RESÍDUOS DE CORVINA

A produção dos biossurfactantes a partir dos resíduos de pescado foi realizada em cultivo submerso por 72 h, em Erlenmeyers de 500 mL a 200 rpm e 30 °C. Nesta etapa, foram realizados dois planejamentos experimentais que se encontram descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento experimental 3² dos ensaios utilizados biorreatores sem chicanas e com chicanas.

Fator	Nível		
	-1	0	1
Resíduos de pescado (X1)	0,83%	1,66%	2,50%
Micro-organismo (X2)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i>

O meio de cultivo foi composto por: meio mineral mínimo e resíduos de corvina. A composição do meio mineral foi: 4 g de NH₄NO₃; 4,0822 g de KH₂PO₄; 0,0008 g de CaCl₂; 10,7182 g de Na₂HPO₄; 0,1971 g de MgSO₄; 0,0011 g de FeSO₄ e 0,0015 g de EDTA em 1 L (COOPER et al., 1987). Os micro-organismos foram utilizados na concentração de 2% (v/v) e o pH inicial do meio foi 7,0.

ATIVIDADE EMULSIFICANTE

A atividade emulsificante do meio foi analisada através da utilização de 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo de soja. Essa mistura foi para um agitador vortex a 700 rpm por 1 min. Após 24 h de repouso, foi realizada a leitura dos dados da relação entre a altura total do óleo e a altura do óleo emulsificado, caracterizando a atividade emulsificante água/óleo (BRODERICK e COONEY, 1982).

TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial foi determinada por um tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha) através da utilização do método do anel Du Nouy (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006).

Antes de medir a tensão superficial, o meio de cultivo foi centrifugado a 6067 G por 15min. Quando os biossurfactantes estavam liofilizados, estes foram dissolvidos em meio líquido e então, realizada a medição da tensão superficial.

DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH das amostras foi realizada diretamente em pHmetro digital da QUIMIS, modelo Q400AS.

LIOFILIZAÇÃO

Somente foi liofilizado o ensaio que apresentou maior redução da tensão superficial. A secagem dos biossurfactantes foi realizada em liofilizador de bandeja, modelo L108 da marca Liotop, no qual 1 L de biossurfactante foi transferido para 5 bandejas do liofilizador, cerca de 200 mL em cada bandeja, e armazenada por 48 h em ultrafreezer (-86 °C). Após, as bandejas foram colocadas no liofilizador e permaneceram por 48 h a -55 °C sobre pressão de 100 µHg. Ao término do processo de liofilização, foi calculado o rendimento do processo. Após a liofilização os biossurfactantes foram diluídos em água destilada nas proporções de 1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, e então, avaliados em cada diluição a tensão superficial e atividade emulsificante.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DO SORO DE QUEIJO

Como pode ser observado pela tabela 3, o soro de queijo possui alto teor de umidade sendo este próximo a 97%, este valor elevado é em decorrência da água de lavagem do queijo ter sido misturada ao soro obtido no processamento. Consequentemente, este apresenta baixos teores de cinzas, lipídeos, lactose e proteínas. Os valores determinados por alguns autores, OLIVEIRA (1986); LINDEN e LORIENT (1996); TRONCO (1997); KAR e MISRA (1999); FARRO e VIOTTO (2003) demonstraram que para o soro de queijo foram encontrados valores de 93% de umidade, 1,59% de cinzas, 0,78% de proteínas, 0,43% de Lipídeos e 4,90% de lactose.

Tabela 3. Resultados da composição do soro de queijo.

Composição (%)	(%)
Umidade	96,91 ± 0,04
Cinzas	1,02 ± 0,14
Proteínas	0,06 ± 0,02
Lipídeos	1,64 ± 0,02
Lactose	1,25 ± 0,03

Segundo SCINGOETHE et al. (1980) a composição do soro é variável e pode ser afetada pela variedade de queijo produzido, métodos empregados para produção, tratamento térmico do leite, manipulação e outros fatores como época do ano da obtenção do leite, entre outros.

Conhecer a composição da matéria prima utilizada como substrato é importante, pois a partir desta é que teremos informações sobre a composição de nutrientes que são necessários para que os microrganismos possam sintetizar os bioprodutos desejados.

A tabela 4 apresenta os valores de tensão superficial obtido durante o processo fermentativo.

Tabela 4. Determinação da tensão superficial durante o processo fermentativo.

Ensaio	Tensão 0h (mN.m ⁻¹)	Tensão 24 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 48 h (mN.m ⁻¹)
1	40,90 ± 0,81	39,60 ± 1,20	39,40 ± 0,25
2	40,30 ± 1,21	38,73 ± 0,51	38,20 ± 0,32
3	39,50 ± 0,35	40,60 ± 0,45	40,30 ± 0,60
4	42,80 ± 0,65	43,10 ± 0,35	42,90 ± 0,68
5	40,60 ± 0,75	38,84 ± 0,36	38,69 ± 0,35
6	41,00 ± 0,35	41,70 ± 1,25	38,40 ± 0,50

Os dados de tensão superficial obtidos durante a produção de biossurfactantes a partir do soro de queijo em biorreatores sem chicanas apresentaram diferença das tensões iniciais para finais em torno de 2 mN.m⁻¹, mostrando uma pequena diminuição da tensão (Tabela 4). Os valores finais obtidos de tensão não são satisfatórios, pois um valor de tensão superficial de interesse seria inferior ou próximo a 30 mN.m⁻¹. Os fatores que possivelmente contribuíram para que não houvesse uma redução significativa do valor inicial para os valores finais de tensão provavelmente foram, as fontes de carbono e nitrogênio da matéria prima, pois a quantidade destes compostos estava muito reduzida no meio de cultivo. Segundo BANAT et al. (2000), fatores que afetam a produção de biossurfactantes são: a natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, presença de fósforo, ferro, manganês, magnésio no meio de produção e micro-organismos utilizados. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura e agitação, também são importantes.

Ainda referente à fonte de carbono, possivelmente, os micro-organismos não conseguiram sintetizar de forma independente as porções hidrofóbicas e hidrofílicas das moléculas de biossurfactantes devido à síntese da porção hidrofóbica ser dependente do substrato (soro de queijo), sendo necessária a presença de uma fonte de carbono altamente hidrofóbica no meio (PINTO et al., 2009).

Segundo KIRAN et al. (2010) o principal problema relacionado ao uso de fontes/substrato alternativos como meio de cultura é encontrar um resíduo com o equilíbrio certo de nutrientes que permite o crescimento celular e o acúmulo do bioproduto.

PINTO et al. (2009) trabalharam com os mesmos micro-organismos utilizados neste trabalho. Porém, a fonte de carbono utilizada foi a glicose em 72 h de

fermentação. Assim, estes obtiveram valores de tensão final para *Corynebacterium aquaticum* de 28,8 mN m⁻¹ e para *Bacillus subtilis* o valor foi de 58,7 mN.m⁻¹. Estes valores mostram o quanto a produção de biossurfactantes é dependente dos micro-organismos e dos substratos utilizados.

Antes da adição do soro de queijo ao meio mineral a tensão média do meio estava em torno de 60 mN.m⁻¹. Quando adicionado o soro de queijo este valor baixou para tensões entre 40-44 mN.m⁻¹. O soro de queijo utilizado possuía valor de tensão superficial de 43,74 mN.m⁻¹. Segundo MAPA (2003), o baixo valor de tensão superficial deve-se ao efeito exercido pelos lipídeos, quanto maior teor de lipídeos menor a tensão superficial. Além disso, a liberação de ácidos graxos oriundos da hidrólise dos glicerídeos faz com que a tensão também diminua.

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DOS RESÍDUOS DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

Avaliando a composição proximal da corvina (Tabela 5), os teores obtidos de proteínas e gordura da corvina, foram possíveis classificar a espécie estudada como concentração intermediária em proteína (15-20%), e baixo conteúdo de gordura (<5%), conforme classificação de STANSBY, reportado por CONTRERAS (1994) (Tabela 5). A corvina de acordo com YEANNES e ALMANDOS (2003) pode sofrer variação na sua composição conforme os tecidos, sexo, idade do pescado e estação do ano que foi capturada.

Tabela 5. Composição proximal dos resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*).

Composição	(%)
Umidade	73,92 ± 0,47
Cinzas	2,38 ± 0,48
Proteínas	18,97 ± 3,25
Lipídeos	4,49 ± 0,47
Carboidratos	0,24

Os resíduos de pescado apresentam uma composição, com maiores teores de proteínas e lipídeos quando comparados com o soro de queijo. A composição da matéria prima em um processo fermentativo é de fundamental importância para a produção dos compostos de interesse.

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE RESÍDUOS DE PESCADO EM BIORREACTORES SEM CHICANAS

Os valores de atividade emulsificante água em óleo após de 72 h variam de 38-44% (Tabela 6), sendo considerados valores abaixo do ideal, pois segundo BATISTA (2006) além dos biossurfactantes possuem a capacidade de reduzir a tensão para valores abaixo de 40 mN.m⁻¹, estes devem ter a capacidade de estabilizar a emulsão mantendo pelo menos 50% do volume da emulsão original após 24 h da sua formação. Porém, segundo PEIXOTO (2007) que utilizou 25 isolados de *P. aeruginosa* cultivado em meio mineral utilizando como fonte de

carbono glicose e óleo de soja, embora tenha comprovado que haja evidências da produção de biossurfactantes por determinação da tensão superficial, o tensoativo produzido apresentou baixa atividade emulsificante chegando próximo de 0% e em alguns ensaios nem chegou a apresentar atividade emulsificante, apesar de apresentar a propriedade de redução da tensão superficial.

Tabela 6. Resultados da atividade emulsificante para os experimentos em biorreator sem chicanas.

Ensaio	X ₁	X ₂	AE _{w/o} (%) (0 h)	AE _{w/o} (%) (24 h)	AE _{w/o} (%) (48 h)	AE _{w/o} (%) (72 h)
1	-1	-1	50,05	52,08	41,63	40,33
2	0	-1	56,37	54,99	39,21	42,08
3	+1	-1	60,07	52,91	41,63	43,78
4	-1	0	33,42	33,94	37,16	36,74
5	0	0	35,77	42,42	33,02	39,11
6	+1	0	36,05	36,96	35,04	38,49
7	-1	+1	46,75	55,81	39,14	43,88
8	0	+1	36,16	33,27	41,48	37,56
9	+1	+1	41,68	38,40	36,10	42,45

NOTA: X₁= % Pescado; X₂= micro-organismo; AE_{w/o}= Atividade emulsificante (água/óleo).

Neste sentido, pode-se levar em consideração as contribuições de CHEN et al. (2007) que em seus estudos reportaram a existência de biossurfactantes que podem estabilizar (emulsificantes) e outros que podem desestabilizar (desemulsificantes) as emulsões, o que poderia justificar em parte o fato das baixas atividades emulsificantes encontradas.

Além disto, SINGH et al. (2007) relataram que vários fatores podem influenciar na estabilidade da emulsão, tais como viscosidade, razão entre os volumes do líquido e do hidrocarboneto, temperatura ambiente, pH, tipo de agente emulsificante presente na amostra, diferenças de densidade do líquido e tempo de agitação.

Pode observar pelo gráfico de Pareto (Figura 1) que nenhum fator influenciou a atividade emulsificante água/óleo significativamente (p<0,05).

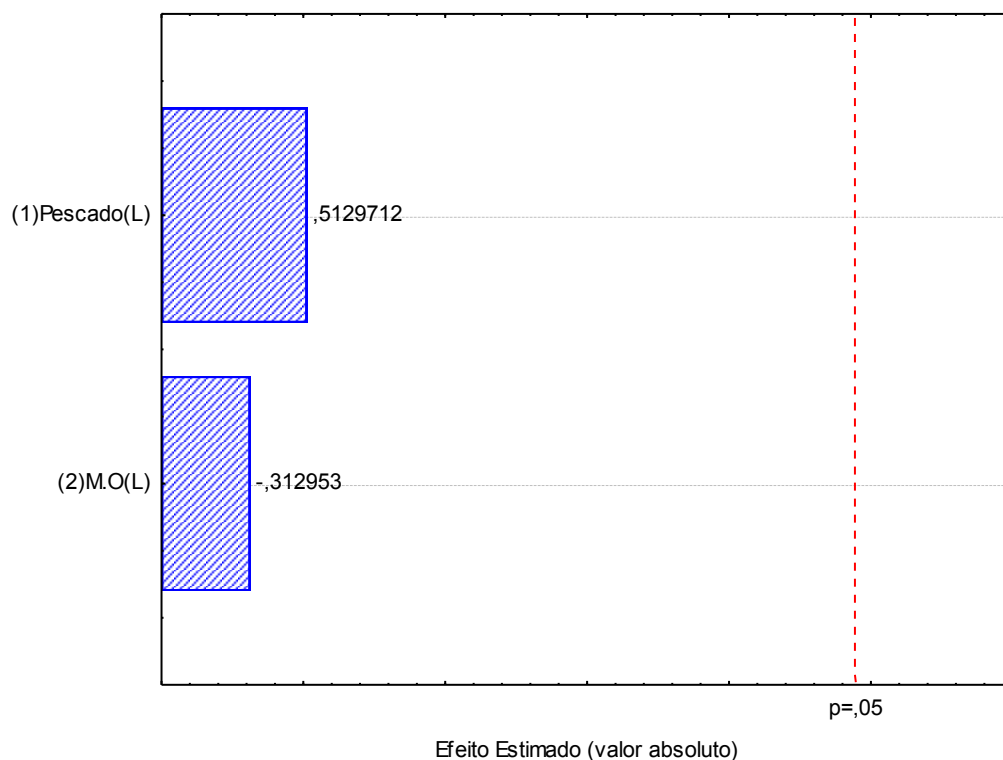


Figura 1. Gráfico de Pareto que demonstra o efeito dos parâmetros do processo em relação à atividade emulsificante.

Em relação a tensão superficial a maioria dos resultados das tensões apresentaram valores abaixo de 30 mN.m^{-1} nas últimas 48 h de fermentação (Tabela 7). Estes resultados são bastante interessantes, já que é considerado um biossurfactante aquele que consegue reduzir a tensão superficial para cerca de 30 mN.m^{-1} . O ensaio 8 foi o que obteve a maior redução da tensão superficial inicial, reduzindo a mesma em $10,56 \text{ mN.m}^{-1}$. O ensaio 8 utilizou concentração de 1,66% de resíduo de corvina e a bactéria *Corynebacterium aquaticum*.

Tabela 7. Resultados da tensão superficial para os experimentos dos ensaios realizando em biorreatores sem chicanas.

Ensaio	X ₁	X ₂	Tensão 0 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 24 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 48 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 72 h (mN.m ⁻¹)
1	-1	-1	40,11	37,00	32,11	35,75
2	0	-1	40,28	33,81	29,73	29,81
3	+1	-1	38,30	33,88	31,76	28,73
4	-1	0	35,56	29,89	26,59	29,75
5	0	0	35,78	37,20	24,28	27,89
6	+1	0	35,60	30,68	28,25	25,68
7	-1	+1	38,90	36,02	36,08	34,53
8	0	+1	38,17	42,76	29,69	27,61
9	+1	+1	35,38	29,61	30,51	28,37

NOTA: X₁= % Pescado; X₂= micro-organismo

Queiroga et al. (2003) utilizando *Bacillus subtilis* em fermentação submersa e como fonte de carbono petróleo bruto, obteve tensão final de 25,7 mN.m⁻¹. PINTO et al. (2009) utilizando a *Corynebacterium aquaticum* e como fonte de carbono glicose obtiveram uma tensão superficial de 28,8 mN.m⁻¹.

Avaliando o planejamento estatisticamente, foi observado pelo gráfico de Pareto (Figura 2) que somente um fator influenciou a tensão superficial significativamente ($p < 0,05$), que o foi o pescado (L), tendo este efeito negativo, portanto, quanto maior a quantidade de pescado menor a tensão superficial (Figura 2).

Em relação ao pH, o mesmo apresentou pequenas oscilações durante o processo fermentativo. Todos os ensaios iniciaram com pH 7,00 e durante o processo houve pequenos acréscimos do pH, sendo que ensaio que obteve maior variação foi o 6 onde o pH final foi de 7,50.

PLANEJAMENTO COM BIORREADORES COM CHICANAS

Na tabela 8 se encontra o resultado de atividade emulsificante água em óleo obtidos nos biorreatores com chicanas.

Em relação à atividade emulsificante água em óleo após 72 h pode ser observado que variaram de 36-45%, sendo considerados valores abaixo do ideal (Tabela 8). Ocorreu o mesmo nos ensaios com biorreatores sem chicanas no qual os valores de atividade emulsificantes ficaram próximos de 40%. BUENO et al, (2010) utilizando *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* em substrato com óleo diesel, obtiveram após 72h fermentação 11,11% de atividade emulsificante para *Bacillus subtilis* e 44,40% para o *Bacillus pumilis*.

AGUIAR et al. (2015) no estudo de produção de biossurfactante utilizando resíduo de pescado e os micro-organismo *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*, verificou que houve redução da atividade emulsificante durante o processo, obtendo valores entre 37-42 %, portanto obtendo valores próximos deste trabalho.

Avaliando estatisticamente os resultados, somente a variável pescado dois fatores apresentou influência significativa ($p > 0,05$) na atividade emulsificante água/óleo, sendo este pescado (L).

O pescado (L) obteve efeito negativo, mostrando que o aumento da concentração de pescado diminui a atividade emulsificante (Figura 3).

A tabela 9 apresenta os resultados das tensões superficiais para os ensaios com biorreatores com chicanas, podemos observar que a maior redução da tensão superficial foi no ensaio 7, o qual reduziu a tensão inicial em 15,66 mN.m⁻¹ obtendo uma tensão final de 23,74 mN.m⁻¹. O ensaio 7 foi realizado utilizando 0,83% de pescado e a bactéria *Corynebacterium aquaticum* (Tabela 9).

BUENO et al. (2010) utilizando *Bacillus subtilis* e *Bacillus Pumilis*, e como fonte de carbono: glicose, frutose, sacarose manitol e caldo de cana, obtiveram após 72 h de fermentação, um valor médio de 54,00 mN.m⁻¹ para todos os ensaios. Todos os resultados obtidos, neste estudo, para *Bacillus subtilis* foram menores, mostrando que este micro-organismo se adaptou melhor ao substrato

com pescado, conseguindo produzir biossurfactantes com tensões superficiais mais baixas. Os valores de tensão superficial foram mais baixo que obtido por LUNA et al. (2015) onde estudou produção de biossurfactante com diferentes resíduos agroindustrial utilizando *Candida sphaerica* obtendo valores mais altos de tensão superficial em torno de 27 mN.m⁻¹.

Pelo gráfico de Pareto (figura 4) observar-se que nenhum dos fatores influenciou a tensão superficial significativamente ($p < 0,05$).

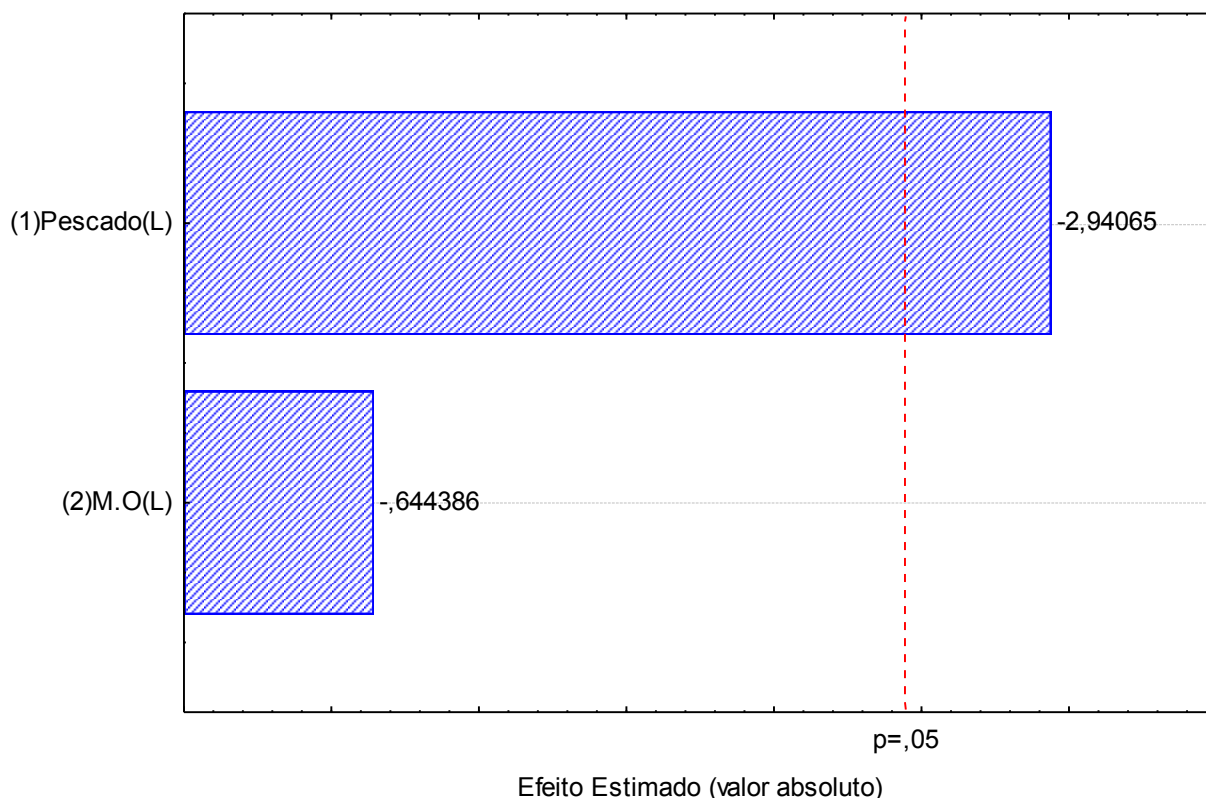


Figura 2. Gráfico de Pareto que demonstra o efeito dos parâmetros do processo em relação a tensão superficial.

Tabela 8. Resultados da atividade emulsificante utilizando biorreator com chicanas.

Ensaio	X ₁	X ₂	AE _{w/o} (%) (0 h)	AE _{w/o} (%) (24 h)	AE _{w/o} (%) (48 h)	AE _{w/o} (%) (72 h)
1	-1	-1	45,53	54,85	37,85	42,30
2	0	-1	51,44	54,24	41,18	45,01
3	+1	-1	39,39	29,51	38,94	39,31
4	-1	0	40,20	34,89	37,69	41,65
5	0	0	37,98	38,52	44,76	40,51
6	+1	0	37,10	33,90	36,10	35,82
7	-1	+1	41,35	36,73	44,31	39,86
8	0	+1	42,42	26,96	40,47	39,65
9	+1	+1	40,72	40,62	37,16	36,16

NOTA: X₁= % Pescado; X₂= micro-organismo; AE_{w/o}= Atividade emulsificante (água/óleo).

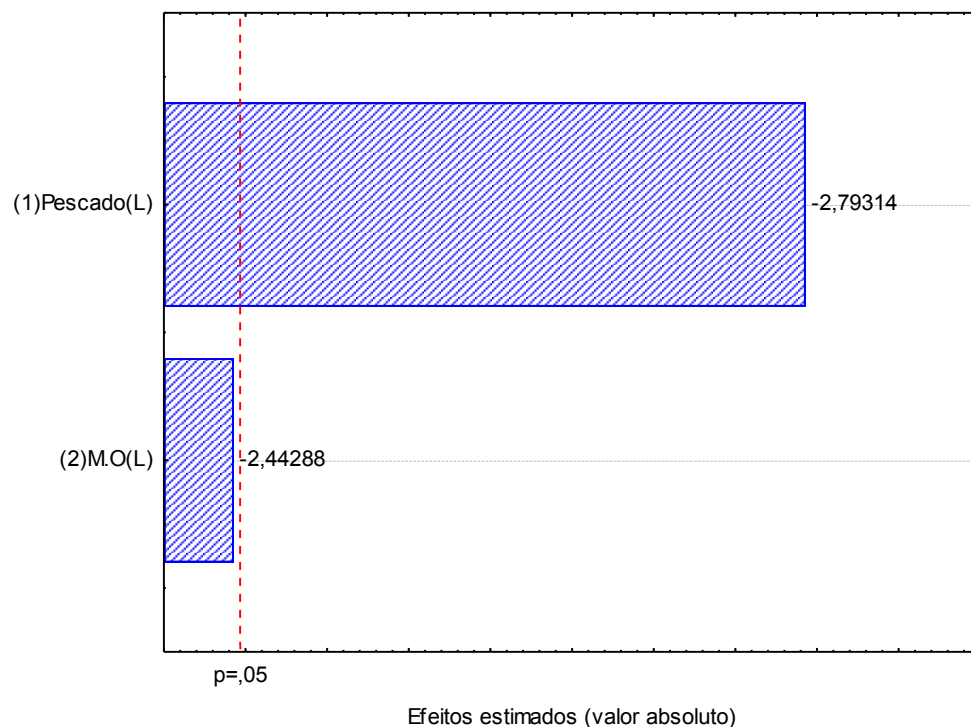


Figura 3. Gráfico de Pareto que demonstra o efeito dos parâmetros do processo em relação a atividade emulsificante obtidos com biorreator com chicanas.

Tabela 9. Resultados da Tensão para os experimentos em biorreator com chicanas.

Ensaio	X ₁	X ₂	Tensão 0 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 24 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 48 h (mN.m ⁻¹)	Tensão 72 h (mN.m ⁻¹)
1	-1	-1	40,16	39,06	39,93	39,51
2	0	-1	39,05	39,15	38,64	37,86
3	+1	-1	38,53	38,46	29,43	23,68
4	-1	0	39,53	42,11	29,69	25,52
5	0	0	36,33	34,43	28,92	30,91
6	+1	0	35,46	32,16	29,40	29,71
7	-1	+1	39,40	40,53	30,00	23,74
8	0	+1	38,86	42,83	29,73	27,13
9	+1	+1	38,99	44,16	35,20	23,36

NOTA: X₁= % Pescado; X₂= micro-organismo

Comparando os resultados dos ensaios em biorreatores com chicanas e sem chicanas pode-se verificar que os biossurfactantes produzidos por ambos apresentaram atividade emulsificante próxima de 40%, portanto, os diferentes biorreatores não influenciaram esta propriedade. Em relação à tensão superficial, os ensaios que utilizou os biorreatores com chicanas apresentaram menores valores, provavelmente devido a maior turbulência e conseqüentemente maior aeração provocada pelas chicanas, o que acaba por proporcionar uma maior produção dos biossurfactantes. Segundo SCHMIDELL (2001) a aeração e agitação são dois fatores importantes que influenciam a produção de biossurfactantes,

pois facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa e isso faz com que aumente a produção.

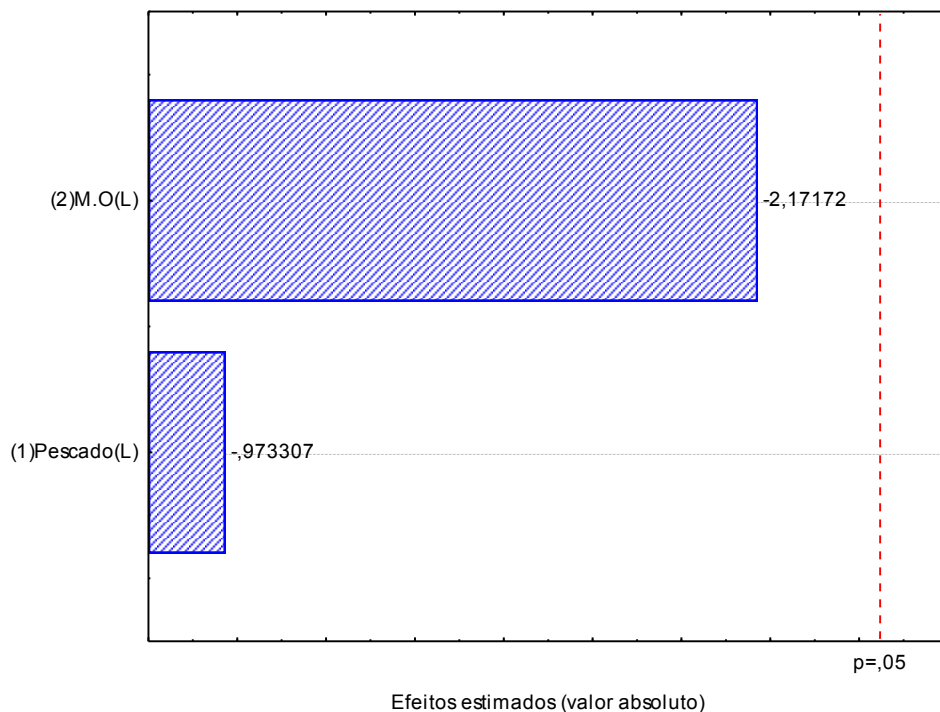


Figura 4. Gráfico de Pareto que demonstra o efeito dos parâmetros do processo em relação a tensão superficial em biorreator com chicanas.

LIOFILIZAÇÃO

Os biossurfactantes produzidos no ensaio 8 do planejamento que utilizou os biorreatores com chicanas foram liofilizados. O ensaio 8 utilizou 0,83% de pescado como substrato e o micro-organismo *Corynebacterium aquaticum*. Foi liofilizado 1 L do cultivo de biossurfactantes obteve cerca de 19,51 g de produto liofilizado. Após a liofilização, os biossurfactantes foram diluídos em água destilada esterilizada a fim de verificar se o mesmo retornaria a ter a mesma característica dos biossurfactantes antes de ser liofilizado (Tabela 10).

Tabela 10. Tensão superficial e atividade emulsificante do biossurfactante liofilizado.

Ensaio	Concentração	Tensão Superficial (mN m^{-1})	Atividade emulsificante (%)
1	1:1	24,3	40,30
2	1:5	28,6	40,91
3	1:10	30,9	42,74
4	1:100	40,5	41,48
5	1:1000	53,1	43,43

Na diluição de 1:1 (água:biossurfactante), a tensão superficial e a atividade emulsificante se mantiveram mais próximas dos biossurfactantes antes da

liofilização. O valor antes da liofilização era de 23,74 mN.m⁻¹ para tensão superficial e 39,86% de atividade emulsificante. Os dados demonstram que o processo de liofilização não afetou a atividade emulsificante e a tensão superficial dos biossurfactantes. Obviamente, que a medida que foi aumentada a diluição, a tensão superficial e a atividade emulsificante também aumentaram. Também é importante salientar que os biossurfactantes secos possibilitam maior facilidade no transporte e armazenamento.

CONCLUSÃO

A produção de biossurfactantes a partir do soro de queijo não apresentou resultados satisfatórios. Deste modo, é preciso considerar a necessidade de enriquecer o meio ou utilizar outra fonte de carbono a fim de obter melhores resultados. Já o cultivo utilizando os resíduos de pescado em biorreator com chicanas obteve menor tensão superficial do que sem chicanas, portanto, o biorreator demonstrou ter importância no processo, sendo que biorreator com chicanas possibilitou maior aeração e com isso maior oxigenação, auxiliando assim o crescimento microbiano e promovendo uma maior produção de biossurfactantes. Em relação à liofilização dos biossurfactantes, os resultados encontrados são importantes, pois há escassez de trabalhos na literatura que verificam o comportamento dos biossurfactantes submetidos a processos de secagem. Outro fator importante é que secagem facilita o processo de armazenamento e transporte.

Por fim, em termos de aplicabilidade, os biossurfactantes produzidos com resíduos do pescado Corvina poderão ser aplicados em derramamentos de óleo, tratamento de efluentes oleosos, processos de biorremediação, entre outras aplicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro; e aos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos (LTA) e Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelo apoio técnico e disponibilidade da estrutura física.

Production of biosurfactants from different agro-industrial wastes

ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active substances with numerous applications. Production of biosurfactants from 5, 10 and 15% whey was performed by *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium aquaticum* a concentration of 2% and the minimum mineral medium. The cultivation was carried out at 200 rpm, 30 °C for 48 h. For residues of corvina 2 factorial experimental design 32, where the influence of micro-organisms (2%) and the concentration of fish 0.83, 1.66 and 2.50% were evaluated were performed. One of the plans was carried out in Erlenmeyer flasks with baffles and another in flasks without baffles. Growing conditions were shaken at 200 rpm, 30 °C for 72 h. The crops that the whey used as a substrate had low reduction in surface tension. In the cultures with fish residues there was reduction of the surface tension to values close to 24 mN.m⁻¹ in the bioreactors with baffles and 27 mN.m⁻¹ for the baffles without baffles. The best result was obtained in biorreatotes with baffle where the concentration of 0.83% of fish and the microorganism *Corynebacterium aquaticum* were obtained, obtaining 23.74 mN.m⁻¹ of surface tension, being the value obtained smaller than value of the biosurfactant most referenced in the literature, Surfactina, which has of 27 mN.m⁻¹.

KEYWORDS: emulsifying activity; waste corvina; cheese whey; surface tension.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. P. S.; MARTINS, V. G.; MARTINS, P. C.; BOSCHERO, R. A.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Influência do meio mineral na produção de biossurfactantes. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, 7, n.1, 115-122, 2015.

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**.16th Edition.Arlington. Virginia. USA, 1995.

BADOLATO, E. S. G.; CARVALHO, J. B.; AMARAL, M. M. R. P.; TAVARES, M.; CAMPOS, N. C.; AUEDPIMENTEL, S.; MORAIS, M. Composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n.1, p. 27-35, 1994.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Microbial production of surfactants and their comercial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.5, p.495-508, 2000.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, p.868-875, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Municipal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Desembarque de Pescado no Rio Grande do Sul. Rio Grande, **IBAMA**, p.9, 2005.

BRODERICK L. S.; COONEY J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Developments in Industrial Microbiology**. v.23, p.425-434, 1982.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**. v.33, n.7 , p.1572-1577, 2010.

CONTRERAS - GUSMÁN, E. S. Bioquímica de Pescado e Derivados. Jaboticabal: **Fundação Universidade Estadual Paulista**, p.538, 1994.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two Bacillus species. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, n.2, p.224-229, 1987.

CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G.; J. **American Oil Chemists Society**, v.79, p.467, 2002.

COSTA, R. J., PEREIRA, M. R., NASCIMENTO, D. S. **Biorremediação de ambientes aquático e terrestre utilizando biossurfactante produzido através de fermentação em estado sólido**. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

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

FARRO, A. P. C.; VIOTTO, L. A. Redução do teor de gordura do soro de queijo pré-tratado por microfiltração. In: **4º Congresso Ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas**. Anais, Florianópolis. CITEM 2003.

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.

FOX, S.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, n. 75, p.235-240, 2000.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 68-87, 2012.

GONÇALVES, É. C. B. A. **Análise de Alimentos: uma visão química da nutrição**. Edição 2ª. Editora Varela, São Paulo, p.175, 2009.

HABA, E.; ESPUNY, M. J; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.379-387, 2000.

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

KAR, T.; MISRA, A. K. Therapeutic properties of whey used as fermented drink. **Revista de Microbiologia**, v.30, n. 2, p.163-169, 1999.

KIRAN, G. SEGHAL et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2389-2396, 2010.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica Agroindustrial-revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza (España): Acribia. 1996.

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 480, p. 413-418, 2015.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, p. 91, 2006.

Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 51 de 18/09/2002**. MAPA, Brasil. 2003.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2004.

MANI, P.; SIVAKUMAR, P.; BALAN, S. S. Economic Production and Oil Recovery Efficiency of a Lipopeptide Biosurfactant from a Novel Marine Bacterium *Bacillus simplex*. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 102-110, 2016.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. Ciência e tecnologia, 2 ed., Campinas: UNICAMP. 1986.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**. v.12, p.633-654 2011.

PEIXOTO, R. DE M. **Bioprospecção de microorganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2007.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p.2104-2108, 2009.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of food industry waste for high-value products. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 58-69, 2016.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo - Perspectivas e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**. v.2, p.20-27, 2002.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**. v.28, p.109-116, 2006.

SCHMIDELL, W. **Agitação e aeração em biorreatores. Em Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzami, W., eds.; Edgard Blucher Ltda: São Paulo, cap.14, 2001.

SINGH A; VAN HAMME, J. D; WARD, O. P. Surfactante in microbiology and biotechnology: Part2. Application aspects. **Biotechnol Adv**. v.25: p.99-121. 2007.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Guaíba. UFSM. p.144, 1997.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M.E. Estimation of fish proximate composition starting from water contend. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.81-92, 2003.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast *yarrowia lipolytica* ncm 3589. **Journal of Basic Microbiology**. v.42, p.67-73, 2002.

Recebido: 01 mai. 2016.

Aprovado: 15 ago. 2018.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n2.3944

Como citar:

AGUIAR, G. P. S. Produção de biossurfactantes a partir de diferentes resíduos agroindustriais. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 117-135, abr./jun. 2018. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Gean Pablo Silva Aguiar

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Direito autorial: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

