

EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEO POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 569

Mayara Luiza de S. Pereira¹; Prof^a. Dr^a. Ester Gouveia Ribeiro⁴

Universidade Federal de Pernambuco, maylsp252gmail.com

Resumo: A produção de ramnolípídeo foi investigada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, utilizando glicerol e nitrato como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. Houve produção de ramnolípídeo, medido pela concentração de ramnose, pelas cinco linhagens, assim como consumo do glicerol. As concentrações de ramnose variaram entre 0,05 e 1,38 g/L. A tensão superficial foi menor que 20 mN/m em todos os casos e o índice de emulsificação variou entre 57 e 79 %. A linhagem (UFPEDA 569) que apresentou menor produção (0,05 g/L) foi selecionada, numa tentativa de aumentar a produção do biossurfactante. Para isso, foram realizadas modificações no meio de cultura, com relação às concentrações de glicerol e de nitrato. Foi aplicado um planejamento composto central rotacional, realizando-se um total de 10 ensaios, sendo quatro ensaios do planejamento fatorial, quatro dos pontos axiais e mais dois ensaios no ponto central. Apesar de não ter sido ajustado satisfatoriamente um modelo quadrático, dependendo das concentrações dos fatores, houve aumento de até 12 vezes em relação ao meio inicialmente utilizado. As melhores concentrações de glicerol e de nitrato de sódio foram 20 e 6 g/L, respectivamente.

Palavras-chave: ramnolípídeo, ramnose, glicerol, nitrato.

1. Introdução

Os biossurfactantes são metabólitos microbianos de superfície ativa, que possuem moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, por isso tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade. A formação de um filme molecular, nas interfaces reduz a tensão superficial.

São produzidos por microrganismos que possuem propriedades surfactantes, como *Pseudomonas* e *Bacillus*. A maioria dos biossurfactantes são aniônicos ou neutros, a porção hidrofóbica é constituída por ácidos graxos, enquanto a porção hidrofílica pode ser um carboidrato ou um aminoácido, por exemplo.

São biodegradáveis tanto na água como no solo, produzidos a partir de fontes renováveis (biodiesel), possuem baixa toxicidade e funcionam sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade. São adequados para várias

atividades industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e capacidade espumante.

As principais classes são: glicolípídios, lipopeptídios fosfolípídios e ácidos graxos. Os microrganismos produzem uma ampla variedade de biossurfactante, de alto e baixo peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolípídios ou lipopeptídios, que são mais eficazes em reduzir a tensão superficial. Os de maior peso molecular são os polissacarídeos, que são estabilizadores eficazes na emulsão de óleos. Os glicolípídeos dividem-se em trealose, sofrólípídio e ramnolípídio em geral estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de menor polaridade. Os fosfolípídios encontram-se presente em todos os microrganismos, com poucos exemplos de produção extracelular, os lipopeptídios são produzidos pelo microrganismo *Bacillus* e dentro dos ácidos graxos o principal é o ácido ustilágico.

A função exata dos biossurfactantes ainda não é completamente conhecida, mas teve algumas funções atribuídas, como, alguns microrganismos podem usar surfactantes ligados a parede celular para se aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com as suas necessidades de encontrar novos habitats, possuindo assim mobilidade e também possuem atividade antibiótica. A maior aplicação dos biossurfactantes se encontra na indústria de petróleo (solubilizando os principais componentes das membranas microbianas), de produtos de higiene, de limpeza (na produção de sabões e detergentes). Mas também promovem a biorremediação de águas e solos, pela sua capacidade de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, acelerando assim a degradação destes compostos no ambiente. O maior interesse no uso em indústrias de petróleo é para recuperação microbiana do óleo. Tem aplicações terapêuticas, são usados na agricultura na formulação de herbicidas e pesticidas. Também aplicável na indústria alimentícia na emulsificação de matéria-prima.

Os ramnolípídios são glicolípídios produzidos durante a fase estacionária de crescimentos de *Pseudomonas aeruginosa*, um dos fatores que influênciam a produtividade de ramnolípídios é a relação carbono/nitrogênio. A produção é atividade sob condições de limitação de nitrogênio. As fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato) são mais utilizadas, por serem reportadas como melhores que as fontes orgânicas. Os ramnolípídios apresentam em sua estrutura 1 ou 2 moléculas de ramnose. O gênero *Pseudomonas* utiliza como substrato (fonte de C) glicerol, e frutose para produzir biossurfactante do tipo ramnolípídio, e essa produção

umenta em condições de estresse. Nitrato é a melhor fonte de nitrogênio.

A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria gram-negativa, pode ser isolada de diferentes habitats incluindo água, solo e as plantas. É um patógeno humano que causa infecções nosocomial sérias e também é resistente a antibióticos.

2. Objetivos

Comparar a produção de biosurfactante por cinco linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos e investigar diferentes razões C/N na produção do ramnolípídeo.

3. Metodologia

3.1 *Pseudomonas*

Foram utilizadas cinco linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, UFPEDA 573, UFPEDA 569, UFPEDA 615, UFPEDA 572, e UFPEDA 610, pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens, preservadas em tubos inclinados com TSA (Agar Triptona de Soja), foram repicadas em Caldo Nutriente em frascos de 250 mL, contendo 50 mL deste meio. O frasco foi mantido sob agitação (200 rpm) em mesa incubadora rotativa (Newbrunswick) a 30°C por 24 horas. Após este período, 5 mL da suspensão do inóculo foram transferidos para um frasco de 500 ml, com 95 ml do meio mineral, composto de: KH_2PO_4 1,36 g/L, K_2HPO_4 1,42 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,039 mg/L, ZnCl_2 0,021 mg/L, CaCl_2 0,01 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,54 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,041 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/L, NaNO_3 4 g/L e 40 g/L de glicerol, em pH 7,0.

3.3 Métodos analíticos

A concentração de glicerol foi determinada utilizando-se um kit enzimático (Labtest), onde são separados tubos de ensaio para cada uma das linhagens (DA1, D1A1, E2, A5, BB2), e mais dois tubos, um para o branco e outro para a substância padrão, coloca-se 0,5 ml da amostra, e em todos os tubos, sem exceção, coloca-se 1 ml

de triglicerídeo líquido (do Kit enzimático) e no tubo para a substância padrão é colocado 10 microlitros do reagente também do kit. Em seguida essas amostras são colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos, após esse período medir a absorvância no espectrofotômetro. Essas etapas têm de ser realizada no escuro, porque o reagente é sensível à luz, e todos os tubos têm de ser devidamente etiquetados para evitar erros.

A produção de ramnolipídeos foi determinada pela concentração de ramnose utilizando-se o método do ácido tioglicólico (Rahman et al., 2002). Que consiste de 1ml da amostra mais 4,5ml da solução de ácido sulfúrico (6:1) ao caldo livre de células, agitando por 1 minuto, aquecer a 100°C por 10 minutos, adicionar a mistura 0,1ml de solução de ácido tioglicólico a 3 % V/V (recém preparada), agitar novamente por 1 minuto, e guardar em lugar escuro por 3 horas. Por fim, medir a absorvância em dois comprimentos de onda, 400 e 430nm, porque a concentração da ramnose é determinada a partir da diferença das absorvâncias nestes dois comprimentos de onda. Efetua-se essa diferença porque o valor de absorvância obtido na leitura de 430 nm indica a interferência de outros açúcares. Uma curva de calibração foi construída a partir dos dados obtidos da mesma forma das amostras.

O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado segundo a metodologia de Cooper & Goldenberg (1987). Esse método consiste basicamente em misturar 4 ml da amostra com 6 ml de óleo, e permanecer em agitação por 2 minutos. Após a agitação, deixar em repouso por 24 horas. A tensão superficial foi medida em um tensiomêtro colocando-se 40 ml da amostra a temperatura ambiente, e o próprio equipamento mostra o resultado em milinêutrons por metro (mN/m).

Para medir a variação na relação C/N, foi realizado a produção em condições diferentes de glicerol e nitrato, ou seja, relações diferentes de C/N. Após 96 horas em produção no meio mineral, a 30°C, por 150 rpm, foi feito a separação das células por centrifugação, para determinação da concentração de ramnose e da tensão superficial. Para comparar a melhor relação C/N.

4. Resultados e Discussão

As linhagens para melhor entendimento foram renomeadas, a linhagem UFPEDA 573 passou a ser chamada de E2, a linhagem UFPEDA 569 passou a ser chamada de A5, a linhagem UFPEDA 615 passou a ser chamada de DA1, a linhagem UFPEDA 610 passou

a ser chamada de D1A1, e a linhagem UFPEDA 572 passou a ser chamada de BB2.

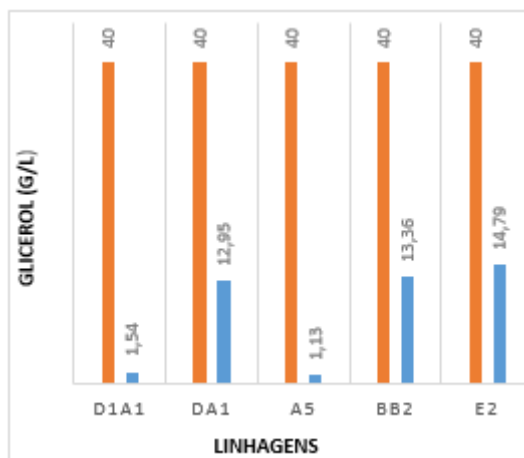


Gráfico 1

Inicialmente se tinha 40g/l de glicerol (graf. 1), que foi a fonte de carbono da *Pseudomonas*, o gráfico acima mostra a quantidade de glicerol restante após a produção, o que permite notar quanto foi consumido dessa fonte de carbono. A5, D1A1 tiveram o maior consumo e E2, BB2 e DA1 tiveram o menor consumo. O consumo de glicerol ficou entre 25 a 37 g/L.

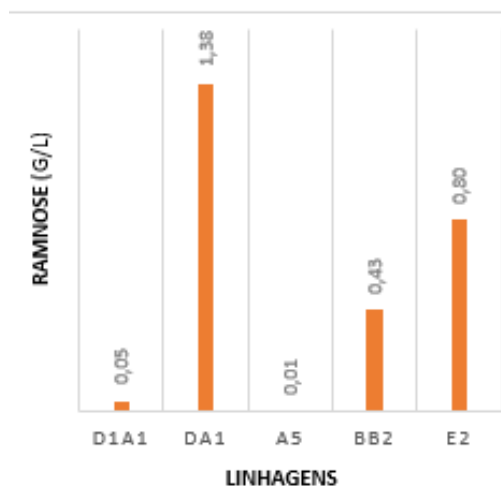


Gráfico 2

Já o teste de ramnose é feito justamente para determinar a quantidade de ramnose produzida, as concentrações foram determinadas pela diferença entre os dois comprimentos de onda, usando a curva de calibração padrão. Como mostra no gráfico 2 houve produção de

ramnolípido pelas cinco linhagens. As concentrações de ramnose variaram entre 0,05 e 1,38 g/L.

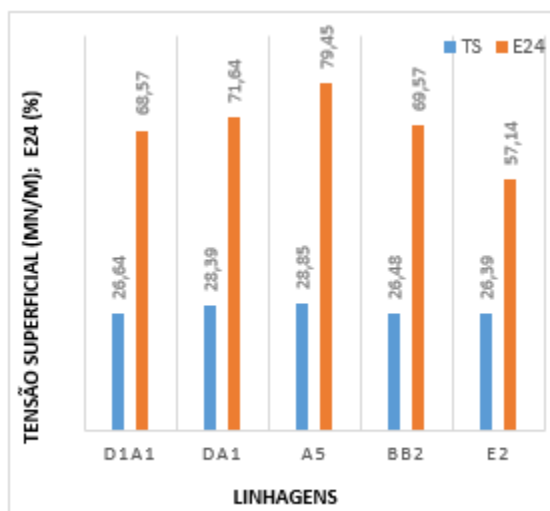


Gráfico 3

Os valores da tensão superficial ficaram entre 20 a 30%, o que mostra que o biossurfactante produzido foi capaz de diminuir essa tensão. Já o índice de emulsificação ou E24 mostra a capacidade de emulsificação desse ramnolípido, todas as 5 linhagens tiveram essa capacidade (graf. 3), o índice de emulsificação variou entre 57 e 79 %. Tanto a tensão superficial, como o E24 são experimentos que demonstram a presença do biossurfactante, ou seja, servem para verificar se a *Pseudomonas* está sendo capaz de produzir ramnolípido.

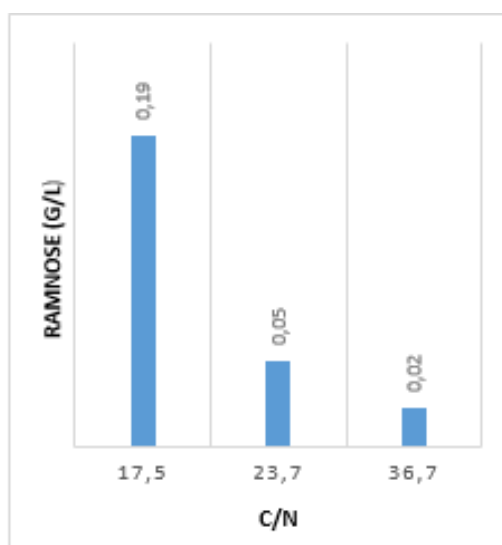


Gráfico 4

Entre as 5 linhagens, foi selecionada a D1A1, por causa de resultados anteriores, e por ser a representada no projeto. À medida que aumentou a razão C/N (graf. 4), houve uma diminuição da produção de ramnolipídeo. O meio de cultura com a razão 17,5 proporcionou um aumento de 3,6 vezes, em relação ao meio inicial, cuja razão foi 23,7. A tensão superficial foi em média 36,2 mN/m nos três casos. Segundo Sousa (2012) ocorreu uma maior produção com a relação C/N igual 12 por *P. aeruginosa*. E Guerra-Santos et al. (1984; *Apud* Abdel-Mawgoud, 2001) teve uma maior produção com C/N entre 16 e 18 também por *P. aeruginosa*.

5. Conclusão

A produção de ramnolipídeo foi dependente da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, já a ação desse ramnolipídeo como emulsificante foi independente da concentração de ramnose. O ramnolipídeo é um biossurfactante em potencial para aplicações em ambientes com pH 4 e temperatura 50°C.

Uma combinação adequada das concentrações de carbono e de nitrogênio proporcionou um aumento na produção do biossurfactante.

6. Referências

- Abdel-Mawgoud, A.M., Hausmann, R.; Lepine, F.; Muller, M. M.; Eric Déziel, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. In: Soberó-Chávez (ed.), Biosurfactants, Microbiology Monographs 20, DOI 10.1007/978-3-642-14490-5_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), p. 224-229, 1987.
- Damião, A. O. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com ramnolipídeos. Dissertação (Biotecnologia), UFBA, 2012.
- Oliveira, A. C. S. M. Recuperação e Purificação de Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-GVIA utilizando Melão

de Cana como substrato. Tese (Engenharia Química), UFRN, 2010.

Pastore, G. M. & Nitschke, M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25(5), p. 772-776, 2002.

Sousa, J. R. Produção de lipopeptídeo e glicolipídeos a partir da bioconversão do co-produto da produção do biodiesel. Tese (Engenharia Química), UFSCar, 2012.

Rahman, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, *Biotechnology Progress*, 18(6), p. 1277-1281, 2002.