

## 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



### TÍTULO DO TRABALHO:

Produção de biossurfactantes do tipo raminolípídeo a partir de rejeitos e substratos de origem petroquímica e agroindustrial

### AUTORES:

Danielly Chagas de Oliveira Mariano<sup>1</sup>, Luiz Fernando Dias Tavares<sup>1</sup>, Patrícia S. Freire de Lima<sup>1</sup>, Denise Maria Guimarães Freire<sup>1</sup> e Bianca Cruz Neves<sup>1</sup>

### INSTITUIÇÃO:

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Química - Rio de Janeiro – RJ

*Este Trabalho foi preparado para apresentação no 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 6ºPDPETRO.*

## **Produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo a partir de rejeitos e substratos de origem petroquímica e agroindustrial**

### **Abstract**

Surfactants are amphiphilic compounds capable of reducing surface and interfacial tension. Biosurfactants are surfactants produced by microorganisms, from a wide variety of carbon sources, such as vegetable oils, agro-industrial and petrochemical wastes, and hydrocarbons. Rhamnolipids, mainly produced by *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, have been applied in many fields, including remediation and bioremediation. The aim of this work was to investigate the production of biosurfactants by the genetically modified strain *B. kururiensis* LMM21 using different carbon sources, and to determine the chemical structure of the produced biosurfactante by Orbitrap mass spectrometry. Best production yields were achieved when crude and purified glycerol, and biodiesel, were used as sole carbon sources. Mass spectrometry analysis indicated a major production of mono-rhamnolipids by the strain *B. kururiensis* LMM21.

### **Introdução**

Surfactantes são moléculas que apresentam como propriedade a redução da tensão interfacial de fases imiscíveis de sistemas heterogêneos, além de reduzir sua tensão superficial. Estas propriedades são derivadas de sua estrutura molecular, onde há a coexistência de uma porção de caráter hidrofóbico com outra porção com maior caráter hidrofílico.

Um dos principais parâmetros de avaliação da eficiência da atividade surfactante é a concentração micelar crítica (CMC), que corresponde à solubilidade do surfactante em fase aquosa ou sua concentração mínima necessária para a formação de micelas. As interações que mantêm estas estruturas coesas são fracas e do tipo hidrofóbicas, de Van der Waals, eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Como não é estabelecido nenhum tipo de ligação química, estas estruturas são facilmente desestabilizadas com a variação de concentração de eletrólitos, temperatura e pH (Sung-Chyr Lin – 1995).

A nova tendência de consumo baseado na consciência ambiental tem levado a busca de novas alternativas para os surfactantes, visto que sua grande maioria é produzida a partir de derivados de petróleo (Nitschke e Pastore, 2002). Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana produzidos, principalmente, sob crescimento aeróbio e em meio aquoso, onde são excretados. Esses bioprodutos encontram aplicação em diversos setores da indústria do petróleo, como, por exemplo, remediação de solos e recuperação melhorada em sua extração. Alguns biossurfactantes já se encontram comercialmente disponíveis. No entanto, seu custo não os torna capazes de competir com surfactantes químicos. Diversos testes realizados com alguns desses produtos envolvendo petróleo brasileiro não demonstraram boa eficiência. Por outro lado, os biossurfactantes do tipo raminolipídeo, produzidos por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (CENPES/PETROBRÁS) previamente selecionada como degradadora de petróleo (Santa Anna, 2001), demonstraram excelente eficiência na biorremediação e lavagem de solos contaminados com petróleo. No entanto, a manipulação de *pseudomonas aeruginosa* pode representar riscos e aumento no custo do processo, por esse micro-organismo ser um patógeno oportunista. Sendo assim, a investigação da produção de biossurfactantes por cepas não patogênicas, como *Burkholderia kururiensis*, vem sendo investigada. Além disso, a utilização desta cepa como hospedeira heteróloga para genes de *pseudomonas aeruginosa* envolvidos na produção de raminolipídeos se apresenta como uma estratégia interessante.

O presente trabalho tem por objetivo a investigação de substratos de origem petroquímica e agroindustrial, além de rejeitos, para produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo pela cepa geneticamente modificada *B. kururiensis* LMM21, e sua caracterização estrutural por espectrômetro de massas do tipo Orbitrap.

## Metodologia

**Bactéria e meio de cultura:** a cepa geneticamente modificada *B. kururiensis* LMM21 (contendo os genes *rhlA* e *rhlB* de *P. aeruginosa* PAO1, envolvidos na síntese de mono-raminolípidos) e a cepa controle, produtora de raminolípidos, de onde foram obtidos os genes para a manipulação genética, *P. aeruginosa* PAO1 foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 20% (v/v) glicerol e estocadas a -80°C.

**Produção de biossurfactante:** Para a produção de biossurfactante, as cepas foram reativadas a partir do estoque a -80°C em LB por 18 horas, a 28°C/170 RPM, inoculadas em meio salino de pré-inóculo MSPI (Santos *et al*, 2002) e incubadas a 28°C/170 RPM no agitador por 40 h. Em seguida, as células foram separadas por centrifugação e, em seguida, inoculadas a uma concentração final de 1g/L em frascos de 500 ml contendo 250 ml de meio salino de produção (MSP) (Santos *et al*, 2002). A fermentação foi conduzida por 240 horas/28° C/170 RPM. Para a investigação das diferentes fontes de carbono, o meio MSP foi suplementado com: glicerol, glicerina bruta, n-hexadecano, óleo de motor, óleo diesel, biodiesel e óleo de oliva, em proporção C/N final de 71.

**Medida do crescimento:** O crescimento bacteriano foi medido através da quantificação de células viáveis, com o plaqueamento de alíquotas em ágar LB e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

**Quantificação de glicolípidos:** Considerando que os biossurfactantes secretados são raminolípidos, a quantificação de glicolípidos extracelulares ocorreu pela quantificação da porção glicídica do biossurfactante (L-raminose) a partir do sobrenadante livre de células, através de um teste colorimétrico descrito por Koch e colaboradores (1991), sendo posteriormente convertidos a raminolípidos (g/L) por um fator obtido através de análise de espectrometria de massas.

**Determinação de propriedades físico-químicas:** A determinação da tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes livres de células foram realizadas em um tensiômetro Aqua-Pi, e calibrado com água pura, a 25 ° C. Para a determinação do índice de emulsificação (%), um método modificado foi utilizado (Cooper e Goldenberg, 1987). Para melhor avaliação, cinco diferentes substratos foram utilizados para os ensaios de emulsificação.

### Análise por espectrometria de massas (Orbitrap)

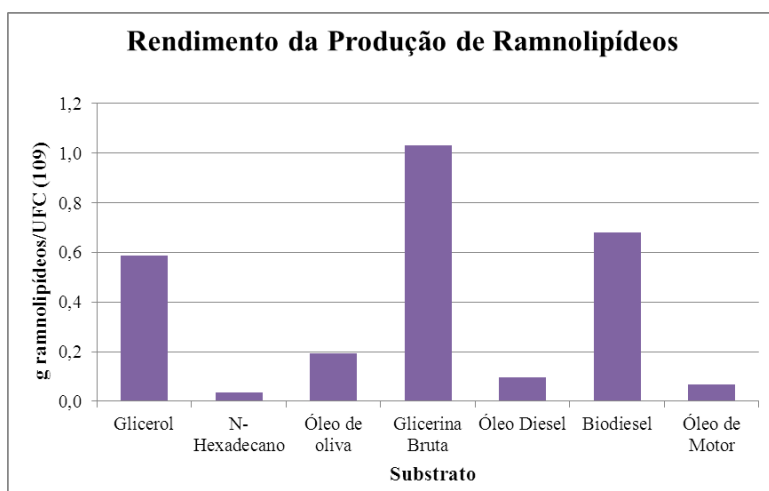
**Preparo da amostra:** Todas as amostras foram diluídas em tampão MS-mix composto por Metanol:Clorofórmio:2-propanol (1:2:4) contendo acetato de amônio 7,5 mM, e posteriormente filtradas em cartuchos contendo membrana PVDF 0.22 µm (Millipore).

**Análise por Injeção Direta em Orbitrap:** As amostras de biossurfactantes foram analisadas em um LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), utilizando capilares de nano-fluxo (PicoTip Emitter, Glass Tip, coating 1P-4P, New Objective, MA, Estados Unidos), com voltagem de ionização de 2,8 kV e temperatura de transferência do capilar a 200°C. Cada aquisição de dados consistiu em uma varredura cobrindo o intervalo entre 100 e 2000 m/z, analisado pelo Orbitrap. Os dados adquiridos foram processados com o auxílio do software Xcalibur, e apenas picos apresentando erros inferiores a 5ppm foram considerados para análises posteriores.

## Resultados e Discussão

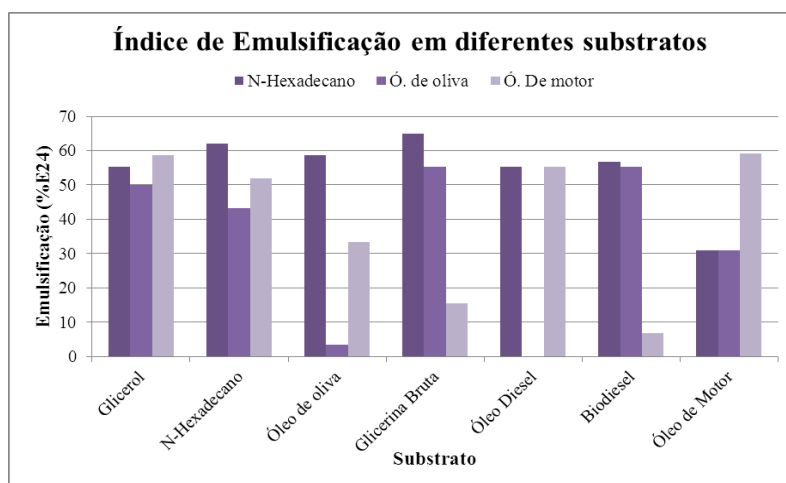
Os resultados observados a partir do rendimento da produção (figura 1) indicam que a glicerina bruta, biodiesel e glicerol apresentam melhores índices de produção de raminolípidos por

células viáveis, chegando a ser cinco vezes superiores que os índices encontrados quando outros substratos foram testados.



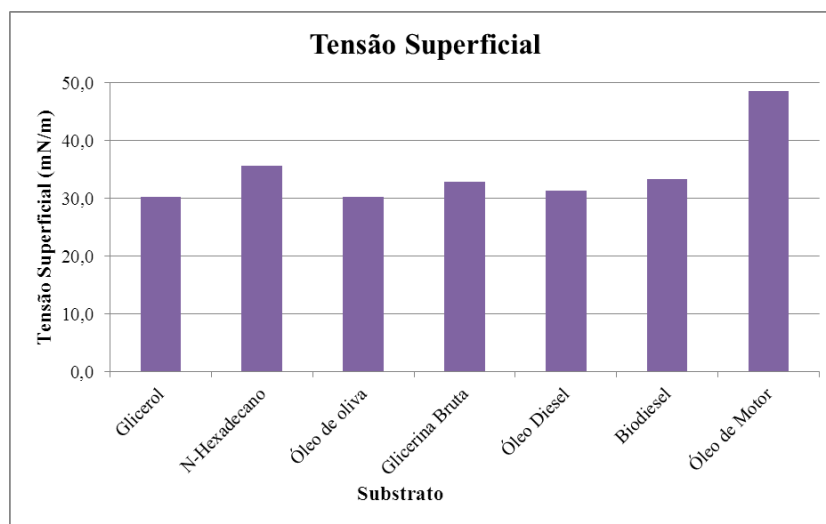
**Figura 1.** Rendimento da produção de raminolipídeos ao fim de 240 horas de cultivo em meio MSP suplementado com diferentes substratos. Resultados expressos em g de raminolipídeos/células viáveis (UFC/mL x10<sup>6</sup>)

As propriedades físico-químicas dos raminolipídeos produzidos pela cepa *B.kururiensis* LMM21, presentes no sobrenadante livre de células, foram verificadas através da medida da emulsificação do sobrenadante com diferentes substratos ( figura 2) e da medida da tensão superficial do sobrenadante (figura 3). A partir dos resultados observados, pode-se concluir que o glicerol e o n-hexadecano apresentaram os melhores índices de emulsificação médios, quando são considerados todos os substratos testados.



**Figura 2.** Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) dos sobrenadantes livres de células obtidos após cultivo da cepa *B. kururiensis* LMM21 por 240 horas em MSP suplementado com diferentes fontes de carbono em diferentes substratos de emulsificação.

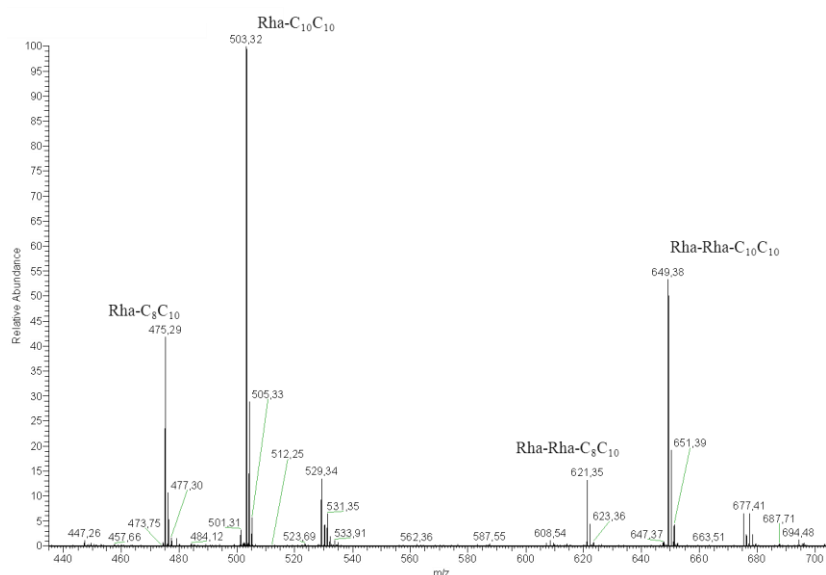
Os valores de tensão superficial (figura 3) apresentam valores similares e estão de acordo com o valor descrito para biossurfactantes que ficam entre 25 e 35 mN/m, exceto o valor encontrado para o óleo de motor que apresentou o índice de 48,5 mN/m.



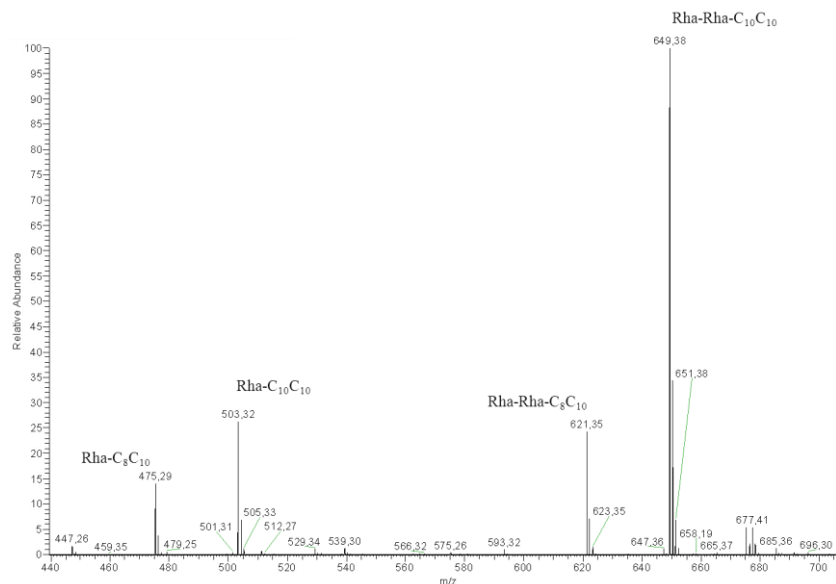
**Figura 3.** Tensão superficial dos sobrenadantes livres de células obtidos após cultivo da cepa *B. kururiensis* LMM21 por 240 horas em MSP suplementado com diferentes fontes de carbono.

Para a caracterização estrutural do biossurfactante, foi selecionado o sobrenadante livre de células obtido após cultivo em meio MSP suplementado com glicerol, por este possuir menos interferentes para a análise. Como padrão, foi utilizado o extrato contendo raminolipídeos produzidos pela cepa *P. aeruginosa* PAO1 nas mesmas condições supracitadas.

A análise do perfil geral de espécies predominantes indicou que no caso da cepa *B. kururiensis* LMM21, houve uma maior produção de mono-raminolipídeos, em detrimento da produção de di-raminolipídeos (Figura 4), o contrário do que ocorre quando o padrão utilizado é analisado (*P. aeruginosa* PAO1), onde ocorre a predominância de espécies pertencentes aos di-raminolipídeos (Figura 5). Estes resultados corroboram com a estratégia molecular abordada, que favorece a produção de mono-raminolipídeos pela superexpressão do cluster *rhlAB*, que codifica para as enzimas pertencentes ao complexo enzimático Raminosil-transferase 1.



**Figura 4.** Espectro de massas obtido após análise do extrato bruto de biossurfactantes produzidos por *B. kururiensis* LMM21 em MSP suplementado com glicerol.



**Figura 5.** Espectro de massas obtido após análise do extrato bruto de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* PAO1 em MSP suplementado com glicerol.

A tabela 1 apresenta mais detalhadamente o percentual de mono- e di-raminolípeidos produzidos pelas duas cepas, indicando a produção de 65,8% de mono-raminolípeidos pela cepa *B.kururiensis* LMM21, contra apenas 23,4% produzidos pela cepa *P. aeruginosa* PAO1.

**Tabela 1:** Perfil obtido após quantificação relativa das espécies principais de raminolípeidos presentes no extrato bruto de sobrenadante livre de células de meio suplementado com glicerol como fonte de carbono por *Burkholderia kururiensis* LMM21.

| Espécie                                                                      | Massa | % Absoluto    |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------|
| <b>Mono-raminolípeidos</b>                                                   |       |               |
| <b>Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>           | 475   | 16.65         |
| <b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>                                      | 503   | 40.98         |
| <b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>/C<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub></b>     | 529   | 5.52          |
| <b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>C<sub>10</sub></b>         | 531   | 2.62          |
| <b>Total</b>                                                                 |       | <b>65,77%</b> |
| <b>Di-raminolípeidos</b>                                                     |       |               |
| <b>Rha-Rha-C<sub>12:1</sub></b>                                              | 505   | 2.30          |
| <b>Rha-Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>       | 621   | 5.33          |
| <b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>                                  | 649   | 21.36         |
| <b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>/C<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub></b> | 675   | 2.60          |
| <b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>C<sub>10</sub></b>     | 677   | 2.64          |
| <b>Total</b>                                                                 |       | <b>34,23%</b> |

**Tabela 2:** Perfil obtido após quantificação relativa das espécies principais de raminolipídeos presentes no extrato bruto de sobrenadante livre de células de meio suplementado com glicerol como fonte de carbono por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

| Espécie                                                                      | Massa | % Absoluto    |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------|
| <b>Mono-raminolipídeos</b>                                                   |       |               |
| <b>Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>           | 475   | 8.21          |
| <b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>                                      | 503   | 15.18         |
| <b>Total</b>                                                                 |       | <b>23,39%</b> |
| <b>Di-raminolipídeos</b>                                                     |       |               |
| <b>Rha-Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>       | 621   | 13.90         |
| <b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>                                  | 649   | 59.54         |
| <b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>/C<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub></b> | 675   | 3.17          |
| <b>Total</b>                                                                 |       | <b>76,61%</b> |

## Conclusões

A investigação de diferentes fontes de carbono indicam que a produção de raminolipídeos é favorecida quando substratos mais facilmente degradáveis são utilizados, sendo observados os melhores resultados em glicerina bruta, seguido de biodiesel e glicerina pura. Como já descrito pela literatura ( Abdel-Mawgod *et al*, 2011), os substratos de origem petroquímica não costumam render índices de produção significativos, o que também pôde ser observado neste trabalho.

Análises em espectrômetro de massas indicam uma maior produção de mono-raminolipídeos pela cepa LMM21, o que tornaria o biossurfactante produzido mais apto à aplicações em remediação por lavagem de solos.

Os resultados demonstram a viabilidade da substituição de uma bactéria patogênica por uma ambiental, de manipulação segura, para a produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos. Estudos sobre a variação da composição da mistura de raminolipídeos em função do sobrenadante, assim como a otimização da produção nos meios que apresentaram melhores resultados se apresentam como etapas futuras para o desenvolvimento deste projeto.

## Agradecimentos

Ao Profº Gilberto Domont, por ceder a infraestrutura para a realização dos ensaios em Orbitrap e ao Profº Magno Junqueira, por auxiliar na utilização do mesmo.

Às agências financiadoras: FAPERJ, CAPES, Petrobras e ANP.

## Referências Bibliográficas

Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two bacillus species. Appl Environ Microbiol, 53, 224-9.

Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., Contiero, J. (2006), Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry* v.41: 483–488

Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2790-8.

Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T., 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng*, 94, 187-201.

Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A., Reiser, J., 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol*, 173, 4212-9.

Nitschke, M. and G. M. Pastore. (2002). BIOSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. *Química Nova* v.25:772-776.

Rahman, K.S., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol Prog*, 18, 1277-81.

Santos, A.S., Sampaio, A.P., Vasquez, G.S., Santa Anna, L.M., Pereira, N., Jr., Freire, D.M., 2002. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol*, 98-100, 1025-35.

Shabtai, Y., Daya-Mishne, N., 1992. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. *Appl Environ Microbiol*, 58, 174-80.

Sim, L., Ward, O.P., Li, Z.Y., 1997. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 19, 232-8.

Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T., Kurane, R., 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 2, 743-9.