

UTILIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE COMO SUBSTITUTO AOS EMULSIFICANTES SINTÉTICOS EM MAIONESES

J.M.CAMPOS¹, T.L.M. STAMFORD² e L.A.SARUBBO³

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição

³ Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciência e Tecnologia

E-mail para contato: jenyffermc campos@gmail.com

RESUMO – Tem sido cada vez mais crescente o uso de biossurfactantes na indústria de alimentos. Devido a isto, o biossurfactante produzido por *Candida utilis* foi avaliado como agente emulsificante em maioneses. Seis formulações foram determinadas utilizando goma guar, carboximetilcelulose e o biossurfactante, isolado ou combinados entre si, avaliando-se a estabilidade das maioneses semanalmente mantidas sob refrigeração a 4°C por trinta dias. Ao final do experimento, observou-se que apenas a formulação contendo goma guar e o biossurfactante mantiveram a emulsão estável ficando as demais formulações com a segregação de duas fases, a aquosa e a lipídica. Com isto, pode-se concluir que o biossurfactante isolado ou apenas os estabilizantes goma guar e carboximetilcelulose não possuem a capacidade de manter a formulação estável por trinta dias e que o biossurfactante apresenta potencial emulsificante desde que seja utilizado combinado com o estabilizando goma guar.

1. INTRODUÇÃO

Devido suas propriedades físico-químicas, o uso de biossurfactantes fazem deles um grupo atrativo de compostos com uso potencial em uma variedade de aplicações industriais e biotecnológicas, como aditivos em alimentos, cosméticos e detergentes (Pacwa-Plociniazak *et al.*, 2011; Marchant e Banat, 2012). O potencial uso de biossurfactantes na indústria de alimentos são conferidas às propriedades emulsificantes, espumantes, umectantes, solubilizantes e agentes antiadesivos (Muthusamy *et al.*, 2008). A propriedade mais comum, na indústria alimentícia é a habilidade de formar emulsões estáveis que promovem textura e cremosidade em produtos lácteos. Biossurfactantes são também usados para retardar aglomeração, solubilizar óleos aromáticos e promover propriedades organolépticas em produtos de panificação e formulações com sorvete e estabilizar a gordura durante a fritura (Banat *et al.*, 2010; Nitschke e Costa, 2007).

É descrito na literatura que em 2004 aproximadamente $\pm 0,2$ milhões de toneladas de surfactantes foram usados em alimentos em um total anual de produção de aproximadamente 10 milhões de toneladas em 2007 (Van Bogaert *et al.*, 2007). Entre as espécies de microrganismos produtores de biossurfactante, o gênero *Candida*, e muitas espécies tem sido sugeridas como

potencial uso benéfico em alimentos incluindo *C. intermedia*, *C. maltosa*, *S. versatilis* e *C. zeylanoides* (Bourdichon *et al.*, 2012).

Na natureza, surfactantes naturais como a lecitina da gema do ovo e várias proteínas do leite são usadas no preparo de muitos produtos alimentícios como maionese, molhos para salada, sobremesas, etc. Mais recentemente, surfactantes sintéticos como ésteres de sorbitano e seus etoxilados e ésteres de sacarose tem sido usado em emulsões alimentícias. Recentemente, Campos *et al.*, (2013) publicaram uma revisão onde descrevem a aplicação dos biossurfactantes na indústrias de alimentos devido suas propriedades emulsificantes, desempenhando um papel na consistência e textura, solubilização de aromas e como estabilizante de sistemas aerados, favorecendo assim o uso em indústrias alimentícias diversificadas.

Desta forma, este estudo objetivou o uso do biossurfactante produzido por *Candida utilis* com propriedade emulsificante, isolado ou combinado com estabilizantes, na produção de uma emulsão estável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Microrganismo: *Candida utilis* (UFPEDA 1009) foi utilizada como produtora de agente surfactante procedente do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram mantidas a 5°C em meio Yeast Mold Agar (YMA) e o crescimento do inóculo foi realizado em meio YMB (Yeast Mold Broth), o qual possui a mesma composição do meio YMA, excluindo-se o ágar. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

Meio de produção e substratos: Para a produção do biossurfactante utilizou-se meio mineral contendo: 0,2% de NH_4NO_3 , 0,01% de KH_2PO_4 , 0,5% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de FeCl_3 , 0,01% de NaCl , 0,1% de extrato de levedura, 6% de glicose acrescido de 6% de óleo de fritura de canola. Os ingredientes foram dissolvidos e o meio esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos, sendo o pH final de 5,7.

2.2. Métodos

Preparação do inóculo: O inóculo foi padronizado transferindo-se a levedura para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi

transferida para frascos contendo 50mL do meio YMB, sendo então incubados sob agitação de 200rpm a 28°C durante 24 horas. Após este período, foram realizadas diluições até obtenção da concentração final de células desejada (10^8 células/mL).

Produção do biossurfactante: As fermentações para produção dos biossurfactantes com atividade de emulsificação foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de produção. Os frascos foram incubados com a suspensão celular e mantidos sob agitação orbital de 200 rpm durante 144 horas, à temperatura de 28°C. Após o cultivo, alíquotas foram retiradas para determinação da tensão superficial, da atividade de emulsificação e do rendimento em produto isolado.

Isolamento do biossurfactante: O líquido metabólico foi inicialmente filtrado em membrana millipore de 0,45 μ m para retirada das células e então submetido aos processos de extração do líquido metabólico pelo método de Cameron *et al.* (1988).

Aplicação do biossurfactante como substituto de emulsificantes: A propriedade emulsificante do biossurfactante foi testada na formulação de um molho para uso em saladas, com a seguinte composição: 40% de óleo de girassol (Bunge), 40,3% de água, 10% de vinagre (comercial), 4% de ovo em pó (Naturivos LTDA, Brasil), 2% de açúcar, 2% de sal, 1% de farinha de mostarda (todos comerciais) e 0,5% de amido instantâneo (Unilever LTDA, Brasil). O biossurfactante isolado de *Candida* foi usado na concentração de 0.7% combinado adicionalmente com o acréscimo de 0.2% de goma guar e 0.2% carboximetilcelulose (CMC) (Cromato Produtos Químicos LTDA, Brasil), na formulação de seis diferentes maioneses descritas na tabela 1. Os ingredientes foram misturados com o auxílio de um agitador durante um minuto à temperatura ambiente. Os molhos obtidos foram armazenados a 4°C durante um mês para inspeção visual de sua aparência (Torabizadeh *et al.*, 1996) e avaliados semanalmente quanto à estabilidade da emulsão.

Tabela 1 – Ingredientes adicionais utilizados na formulação de maionese

Formulação	Ingredientes testados
1	Carboximetilcelulose + goma guar
2	Carboximetilcelulose
3	Carboximetilcelulose + biossurfactante isolado de <i>Candida</i>
4	Goma guar
5	Goma guar + biossurfactante isolado de <i>Candida</i>
6	Biossurfactante isolado de <i>Candida</i>

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta as maioneses formuladas e seu comportamento ao longo das quatro semanas de avaliação. Logo na segunda semana, a formulação seis apresentou separação aquosa

na base do recipiente e que, ao final do prazo estabelecido, tornou-se mais evidente. Pode-se visualizar também que todas as formulações, exceto a 5, desestabilizaram apresentando acúmulo de líquido, evidenciando que não foram 100% estáveis. Ao abrir todos os recipientes, no final do experimento, percebeu-se uma consistência fluida nas formulações 1, 2 e 3, apresentando a formulação 5 uma consistência cremosa, uniforme e estável.



Figura 1- Comportamento das maioneses formuladas com CMC e biossurfactante a 0.7% frente à estabilidade da emulsão formada durante quatro semanas sob refrigeração.

Segundo a ANVISA (2005), maionese é o produto cremoso em forma de emulsão estável, óleo em água, preparado a partir de óleo(s) vegetal(is), água e ovos podendo ser adicionado de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto. É proibida a adição de corantes, e a porcentagem máxima de amido permitida em sua composição é de 0,5%. As emulsões são colóides, misturas heterogêneas compostas de partículas minúsculas suspensas em outro material imiscível.

Um agente emulsionante/emulsificante é a substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento (Portaria 540/97), ou seja, são agentes anfipáticos que alteram as propriedades de alguns alimentos para que eles possam ser misturados, formando uma emulsão. O emulsificante possui moléculas com

extremidade polar, que é atraída pela água, e outra extremidade apolar, que é atraída pelo óleo. Neste estudo, por definição, o biossurfactante atuaria como agente emulsificante devido apresentar tal propriedade. Biossurfactantes podem estabilizar (emulsificar) ou desestabilizar (de-emulsificar) a emulsão (Muthusamy *et al.*, 2008).

A portaria nº 372 (BRASIL, 1999), considerando que o uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e no menor nível para alcançar o efeito desejado (Portaria SVS/MS n.º 540/97) aprovou o uso de aditivos com a função estabilizante para o produto maionese, configurando dentre eles a goma guar e a carboximetilcelulose.

Dentre os óleos mais utilizados na elaboração de maionese, estão o óleo de soja e o óleo de girassol. Alternativamente, outros tipos de óleos estão sendo utilizado na elaboração de maioneses, como o óleo de palma (Chandrasekaran e Bahkali, 2013). A gema do ovo é uma emulsão natural do óleo em água em combinação com proteínas, lecitinas e outros fosfolipídios. A gema, como uma emulsão, forma o núcleo em que a emulsão da maionese é feita, afetando a viscosidade e força da emulsão final.

Em relação aos demais ingredientes descritos na formulação da maionese está a farinha de mostarda. As sementes da mostarda branca ou amarela (*Brassica alba*) contém compostos especiais como glucosinolatos. Estes compostos caracterizam este sabor de mostarda e produtos com mostarda (Tsao *et al.*, 2000; Nadarajah *et al.*, 2005). Apresenta diversas características funcionais, entre elas emulsificante, estabilizante, aglutinantes, conservante e antioxidante. Como agente emulsificante, em produtos tais como maioneses e molhos para saladas, a mostarda em pó é utilizada em níveis de 0,2-0,4% do total como emulsificante adicional e também estabilizante, além de conferir aroma ao produto. Como estabilizante, as finas partículas da mostarda se acumulam na interface óleo/água agindo assim como uma proteção física contra uma quebra da emulsão.

Além de conferir propriedade antimicrobiana, amido e outros hidrocolóides ou gomas são usados mais frequentemente como texturizantes na indústria alimentícia sendo utilizadas em emulsões para estabilizá-las. Tanto a goma guar e carboximetilcelulose, que foram testadas nas formulações a 0,2%, foram utilizadas como estabilizantes em maionese e podem conferir estas propriedades. Em relação à isto, percebe-se na figura 1, que a manutenção da emulsão mais estável, composta com goma guar e biossurfactante, foi conferido pelo poder estabilizante da goma guar e emulsificante do biossurfactante. Isto pode ser comprovado ao se analisar a formulação 6, a qual não apresentou adição de nenhum agente estabilizante havendo a segregação de duas fases visivelmente distintas. Em emulsões relativamente estáveis também houve separação de uma camada, no caso de óleo, em emulsões de alginato após 30 dias de avaliação (Sato *et al.* 2014). Já a levedura de cerveja β -glucano estabilizou a emulsão por 91 dias a 4-6°C e pode ser usada como substituto de gordura em maionese (Marinescu *et al.*, 2011).

A inulina testada entre 0-10% (p/v), por Alimi *et al.* (2013), obteve o melhor resultado na concentração de 5% (p/v). O uso de 0-1% (p/v) goma de alfarroba fornece importante informação sobre a influência de hidrocolóides nas propriedades de modelos multicomponentes em emulsões (Chung *et al.*, 2014). O efeito da goma guar e xantana também pode afetar as

propriedades reológicas do amido, também utilizado na formulação, induzindo efeitos indiretos para melhor preservação da estrutura granular (Heyman *et al.*, 2014). Paraskevopoulou *et al.* (2007) mostrou que polissacarídeos (goma arábica e alginato de propileno glicol) tiveram habilidade de induzir aumento de viscosidade. A aplicação de gel konjac em escala micrométrica indicou que gorduras em maionese substituídas por gel konjac, não mais que 30%, foi bem aceito e demonstrou bom potencial para ser usado como análogo de maionese (Li *et al.*, 2014).

A maioria dos complexos colóides e emulsões que são usados em alimentos e produtos alimentícios são difíceis de estabilizar por causa da grande número de microestruturas de combinações de proteínas, carboidratos e lipídios presentes. Este número infinito de combinações são organizados e arranjados em complexos internos de microestruturas com vários tipos de arranjos entre dispersões, emulsões, espumas, géis, etc. (Kralova e Slöblom, 2009). Como dito anteriormente, a adição do biossurfactante isolado (formulação 6) não foi eficaz na manutenção da emulsão por 30 dias. Soforolipídios de *T. bombicolatensis* tem se mostrado reduzir a tensão superficial e interfacial mas não bons emulsificantes (Cooper e Cavaleiro, 2003). Em contraste, liposan não reduz bem a tensão superficial mas tem sido usado com sucesso na emulsificação de de óleos comestíveis (Cirigliano e Carman, 1985).

4. CONCLUSÃO

Poucos trabalhos na literatura relatam, de fato, a aplicação de biossurfactante na formulação de novos produtos alimentícios inferindo apenas o provável uso em alimentos, diferente do presente trabalho. Com isto, pode-se concluir que a formulação contendo goma guar e biossurfactante isolado de *Candida* associado obteve melhor estabilidade após quatro semanas de avaliação, comprovando a função emulsificante do biossurfactante associado com a função estabilizante da goma guar. Desta forma, este bioemulsificante pode ser utilizado na indústria alimentícia conferindo tal propriedade em emulsões.

5. REFERÊNCIAS

- ALIMI, M.; MIZANI, M.; NADERI, G.; MORTAZAVIAN, A.M.; MOGHADAM, M.B. Development of low-fat mayonnaise containing combined mixtures of different types of inulin. *J. Food, Agric. Environ.*, v. 11, p. 99-104, 2013.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 427-444, 2010.
- BRASIL, Portaria nº 372 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de

26 de abril de 1999. http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/372_99.htm

BRASIL, Portaria nº 540 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de 27 de outubro de 1997.

BRASIL, Resolução RDC nº 276 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de 26 de setembro de 2005.

CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54, p. 1420-1425, 1988.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Progress*, v. 29, p. 1097 - 1108, 2013.

CHANDRASEKARAN, M.; ALI H. BAHKALI. Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology – Review. *Saudi J. Biol. Sci.*, v. 20, p.105–120, 2013.

CHUNG, C.; DEGNER, B.; McCLEMENTS, D.J. Understanding multicomponent emulsion-based products: Influence of locust bean gum on fat droplet – Starch granule mixtures. *Food Hydrocoll.*, v. 35, p. 315–323, 2014.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 50, p. 846-850, 1985.

COOPER, D. G.; CAVALERO, D. A. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.*, v. 103, p. 31–41, 2003.

HEYMAN, B.; DE VOS, W.H.; DEPYPERE, F.; VAN DER MEEREN, P.; DEWETTINCK, K. Guar and xanthan gum differentially affect shear induced breakdown of native waxy maize starch. *Food Hydrocoll.*, v. 35, p. 546–556, 2014.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *J. Dispers. Sci. Technol.*, v. 30, p.1363–1383, 2009.

LI, J.; WANG, Y.; JIN, W.; ZHOU, B.; LI, B. Application of micronized konjac gel for fat analogue in mayonnaise. *Food Hydrocoll.*, v. 35, p.375–382, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.*, v. 11, p. 558-565, 2012.

- MARINESCU, G.; STOICESCU, A.; PATRASCU, L. The preparation of mayonnaise containing spent brewer's yeast β -glucan as a fat replacer. *Romanian Biotechnol. Lett.*, v. 16, p. 6017-6025, 2011.
- MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr. Sci.*, v. 94, p. 736-747, 2008.
- NADARAJAH, D.; HAN, J.H.; HOLLEY, R.A. Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O 157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 99, p. 257-267, 2005.
- NITSCHKE, M.M.; COSTA S.G.V.O. Biosurfactant in food industry. *Trends in Food Sci. Technol.*, v. 18, p. 252-259, 2007.
- PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, S.; CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p.633-654, 2011.
- PARASKEVOPOULOU, D.; BOSKOU, D.; PARASKEVOPOULOU, A. Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. *Food Chem.*, v. 101, p. 1197–1204, 2007.
- SATO, A.C.K.; MORAES, K.E.F.P.; CUNHA, R.L. Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. *Food Hydrocoll.*, v. 34, p. 184–192, 2014.
- TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI H.A. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 29, p. 734-737, 1996.
- TSAO, R.; YU, Q.; FRIESEN, I.; POTTER, J.; CHIBA, M.. Factors affecting the dissolution and degradation of oriental mustard-derived sinigrin and allyl isothiocyanate in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 1898–1902, 2000.