

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DO TIPO LIPOPEPTÍDEOS EM BIORREATOR DE BANCADA

Í. W. L. DE FRANÇA¹, J. A. M. LEMOS¹, B. NOVAIS¹, C. G. LEMOS¹, V. M. M. MELO², H. B. SANTANA¹, L. R. B. GONÇALVES¹.

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia

Email para contato: lrg@ufc.br

RESUMO - Biossurfactantes, ou surfactantes biológicos, constituem uma série de espécies químicas com propriedades tensoativa similares aos surfactantes sintéticos, entretanto com algumas vantagens: baixa toxicidade, reduzida CMC, possibilidade de produção por fontes renováveis, além de tolerância às condições extremas de temperatura, pH e força iônica. Entretanto, a viabilidade econômica da produção em escala industrial de biossurfactantes depende do desenvolvimento de estratégias e processos que visem a minimização dos custos envolvidos no processo, como por exemplo, técnicas estatísticas de otimização. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da agitação e aeração em biorreator de bancada sobre a transferência de oxigênio (k_{LA}) e produção de biossurfactante do tipo lipopeptídeo pela cepa ICA56, através de planejamento experimental. Dentre as condições analisadas, observou-se que a maior produção de biossurfactante (115 mg.L^{-1}) ocorreu em aeração de 1 L.min^{-1} de O_2 e agitação de 200 rpm e que elevadas condições de aeração e agitação maximizam a transferência de oxigênio, mas podem inibir a produção de biossurfactante e o crescimento celular da cepa.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são tensoativos produzidos por bactérias, leveduras e fungos, sendo apresentados como uma substância promissora por apresentarem biodegradabilidade e eficiência em condições extremas de pH, temperaturas e força iônica, além de baixa toxicidade. Essas vantagens, em relação aos surfactantes químicos, concernem aos biossurfactantes uma maior gama de aplicações industriais (NITSCHKE & PASTORE, 2006).

Na indústria petrolífera, biossurfactantes podem ser utilizados na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo, limpeza de reservatórios, agentes emulsificantes e recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

Apesar do esforço das pesquisas, o custo de produção de biossurfactante é de aproximadamente de 3 a 10 vezes maior do que o dos surfactantes químicos. Diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de aumentar a produção de biossurfactantes. A otimização das condições de cultivo (como composição do meio, temperatura, pH e oxigenação) pode ser realizadas através de ferramentas computacionais e estatísticas, como por exemplo planejamento experimental (superfície resposta), lógica fuzzy, algoritmos

genéticos e redes neurais (REIS *et al.* 2013; RAMKRISHNA, 2010).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a influência da agitação e aeração em biorreator de bancada na produção de biossurfactante pela cepa ICA56, por intermédio de ferramentas estatísticas (planejamento experimental).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de estoque

A cepa ICA56 foi previamente isolada de manguezal no município de Icapuí (Barra Grande) no estado do Ceará. Este micro-organismo foi apresentado como potencial produtor de biossurfactante por Lima (2013), por intermédio da identificação do gene *sfp*, responsável pela produção de surfactina, através de técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e foi gentilmente cedido para a realização do presente estudo. A linhagem foi mantida em meio APGE (água/peptona/ glicose/extrato de levedura) e repicada a cada 30 dias.

2.2 Meio de cultivo e inóculo

A cultura estoque da cepa ICA56 foi repicada em placa APGE e incubada a 30°C por 24 horas. Após esse período, três colônias foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio mineral. O frasco (inóculo) foi incubado em agitador a 150 rpm, 30 ° C por aproximadamente 24 horas. Após este período, o inóculo foi adicionado ao biorreator, contendo 2,7 L de meio mineral estéril, contendo glicose como fonte de carbono e suplementado com 0,1% da solução de micronutrientes (BARRETO, 2011).

2.3 Cultivo em biorreator

O biorreator utilizado foi um fermentador convencional Marconi constituído de uma dorna (Marconi) de 4 litros de volume útil com controle e medidor de temperatura, medidor e transmissor de pH, medidor e transmissor de oxigênio dissolvido, motor e agitador mecânico. Além de um sistema de aquisição de dados constituído de placa de aquisição de sinais (*National Instruments*) e programação em LabVIEW (GIRO *et al.* 2009).

2.4 Extração do biossurfactante

O biossurfactante produzido foi extraído do meio fermentado livre de células de acordo com metodologia descrita por Giro *et al.* (2009), por intermédio de extração líquido-líquido com diclorometano como solvente.

2.5 Métodos Analíticos

Determinação da biomassa: O crescimento celular foi obtido por método indireto de turbidimetria pela medida da densidade óptica a 600nm, conforme descrito em Giro *et al.* (2009).

Tensão superficial: Utilizou-se tensiômetro (*Krüss K6*) a 30 °C, segundo a metodologia do anel De Nöuy (COSTA *et al.*, 2006).

Concentração de biossurfactante: Foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), conforme descrito em Yeh *et al.* (2006).

Concentração de Açúcares Redutores Totais: Glicose e frutose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) segundo metodologia de Giro *et al.* 2009

2.7 Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio (k_{LA})

O k_{LA} foi determinado pelo método dinâmico, também conhecido como “gassing-out method”, utilizando-se um eletrodo de O_2 dissolvido, mas sem o borbulhamento de nitrogênio gasoso. Schmidell *et al.* (2001) apresenta um modelo matemático (Equação 1) resultante de um balanço de massa diferencial que permite o cálculo do k_{LA} . A integração analítica do modelo, nas devidas condições de contorno, resulta em um equação linear, cujo coeficiente angular é o k_{LA} .

$$\ln\left(\frac{C_o - C}{C_o - C_1}\right) = k_{LA} \cdot (t - t_1) \quad (1)$$

Na Equação 1, C representa concentração de oxigênio dissolvido, t o tempo e os subscritos indicam o momento em que o sistema de agitação e aeração são restabelecidos, após o desligamento e o momento no qual é observado um valor estacionário na concentração de oxigênio dissolvido.

Foram avaliadas variadas condições de agitação (200, 250, 300 e 350 rpm) e aeração (0,5; 1; 1,5 e 2 L/min de ar) em biorreator de bancada. Estas condições operacionais foram apresentadas por Amani *et al.* (2010) ao estudarem a transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator de bancada e realizarem estudo de superfície resposta para avaliar a influência da agitação e aeração na produção de biossurfactante. Em cada condição operacional do reator, realizou-se análise de crescimento celular, formação de produto e tensão superficial, bem como determinação do k_{LA} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, o aumento de escala de um processo está condicionado a ensaios iniciais em bancadas de laboratório, para que sejam, em seguida, testados em escala semi-piloto e piloto. Após estes estudos, dá-se início a produção em escala industrial. O critério de aumento de escala em sistemas de cultivo aeróbio está relacionado em manter a similaridade entre os coeficientes volumétricos de oxigênio (k_{LA}) (DORAN, 1995).

A Figura 1 apresenta o perfil temporal do oxigênio dissolvido para a condição de 200 rpm e 1 vvm, bem como a linearização da curva proposto pela Equação 1. Esta foi a metodologia utilizada para calcular o k_{LA} em todos os ensaios realizados.

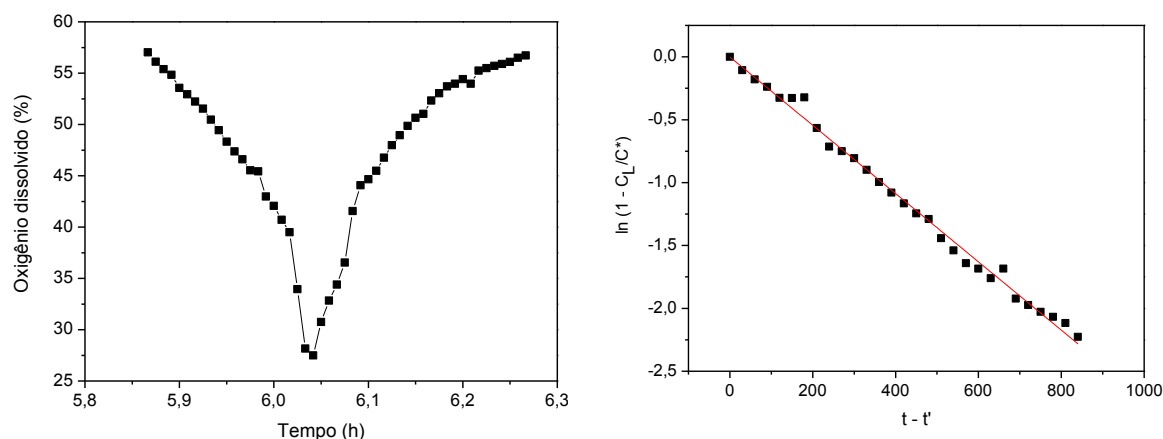


Figura 1 – Cultivo para produção de biossurfactante - Saturações de oxigênio em função do tempo para vazão de 1 L.min⁻¹ de O₂ e agitação de 200 rpm. (O gráfico da esquerda é equivalente oxigênio dissolvido durante o período que k_{LA} foi determinado, e o da direita representa os dados para o cálculo do k_{LA} linearizados pelo modelo proposto).

Nesta condição operacional, foi obtido k_{La} de aproximadamente 10,44 h⁻¹. Os valores de k_{La} , para esta condição, foi inferior do que o encontrado por Amani *et al.* (2010) no cultivo de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactantes. Apesar dos valores obtidos apresentaram valores diferentes, a mesma ordem de grandeza foi observada.

A variação na agitação e aeração do sistema reacional afetaram o crescimento celular (biomassa) e a formação de produto (biossurfactante). A Figura 2 apresenta a superfície resposta para o comportamento da biomassa como efeito das variações na agitação e aeração do biorreator de bancada.

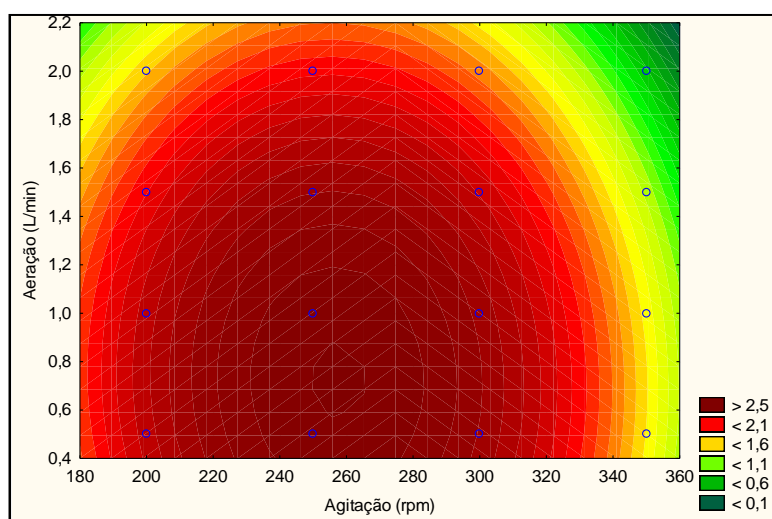


Figura 2 – Superfície resposta para a biomassa (g.L⁻¹) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

Observa-se na Figura 2 que elevadas taxas de aeração prejudicam o crescimento celular e que a agitação apresenta um efeito mais significativo do que a aeração. O maior crescimento celular ocorreu na faixa intermediária de agitação e aeração analisada (em torno de 260 rpm e 1,0 L.min⁻¹).

Schimidell *et al.* (2001) reportaram que a mistura do fluido (sistema reacional) é de crucial importância em bioprocessos, sendo que em cultivos aeróbicos essa é uma operação crítica, pois está diretamente relacionada à transferência de oxigênio para as células. O oxigênio exerce papel fundamental na proliferação da biomassa microbiana e consequentemente na geração de produtos. A taxa com que o oxigênio é consumido pelas células determina a taxa na qual o gás é transferido para o sistema. Normalmente, a demanda específica de oxigênio passa por um período máximo no início da fase exponencial de crescimento microbiano (DORAN, 1995).

Segundo Doran (1995) quando o ar é disperso através do meio líquido, diferentes padrões de fluxo das bolhas de ar podem ocorrer. Se a taxa de agitação é baixa e a de aeração é elevada, o gás envolve o impelidor sem que ocorra dispersão das bolhas, formando um fluxo de ar somente ao longo do eixo da haste do agitador. O aumento da velocidade de agitação faz com que o gás seja capturado sob às pás do impelidor, sendo então disperso através do meio líquido. Já baixas taxas de aeração prejudicam a transferência de oxigênio, e elevadas taxas podem causar turbilhonamento no sistema. O presente estudo observou que o crescimento celular foi mais acentuado em condições moderadas de agitação e aeração.

Neves (2003) afirma que a obtenção de elevadas concentrações de bioprodutos de interesse depende diretamente da transferência eficiente de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, pois a concentração celular deve estar elevada. A Figura 4 apresenta a superfície resposta para o comportamento da produção de biossurfactante como efeito das variações na agitação e aeração em biorreator de bancada.

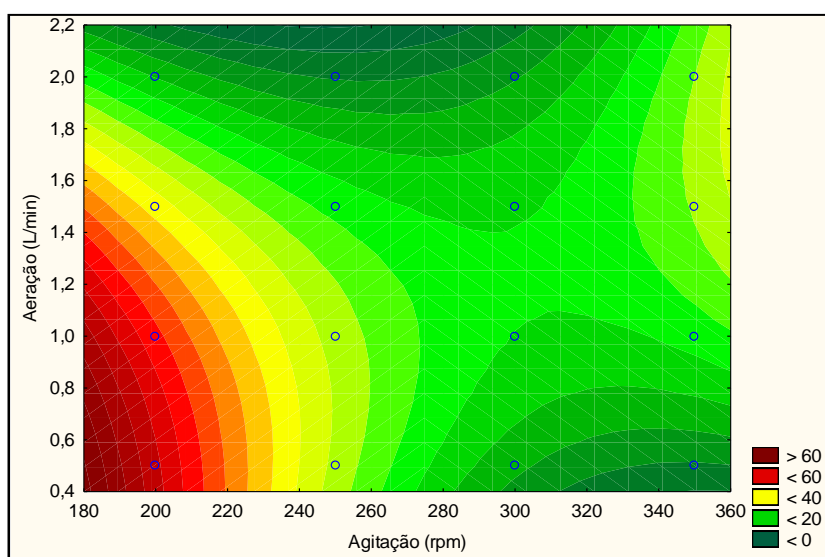


Figura 3 – Superfície resposta para a produção de biossurfactante (mg.L^{-1}), em função das taxas de aeração e agitação, para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

Observa-se na Figura 3 que a maior produção de biossurfactante ocorreu nas condições mais brandas de agitação e aeração (200 rpm e $1,0 \text{ L.min}^{-1}$). Apesar da maior produção de espumas serem geradas em níveis mais altos de agitação, verificou-se por meio da superfície de resposta (Figura 21) que concentração mais elevada de biossurfactante foi obtida nas taxas de aeração e agitação menores (200 rpm e $1,0 \text{ vvm}$). Isto pode ser atribuído ao fato de que as taxas mais baixas de agitação em sistema, salva a perda súbita de líquido, devido à pressão e o fluxo de ar reduzido, o qual facilita o contato entre o oxigênio e o

micro-organismo, causando pouca turbulência ao sistema. Também foi observada a formação de biossurfactante na fase da espuma do sistema estudado, com concentração levemente maior do que a observada no seio do líquido.

Yeh *et al.* (2006) ao cultivarem cepa de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante, observaram que elevada taxa de agitação e aeração, apesar de produzirem considerável quantidade de espuma, prejudica o crescimento do micro-organismo e a produção de surfactina.

Silva (2013) estudou uma faixa ainda mais abrangente de valores de agitação (180 até valores superiores a 400 rpm) e aeração (0,8 até valores superiores a 2,2 L.min⁻¹) e observou o mesmo comportamento que o presente trabalho. Silva (2013) observou que a maior produção de biossurfactante por cepa de *Bacillus subtilis* ocorreu na condição de agitação de 200 rpm e 1 L.min⁻¹, apesar de que em condições mais severas de mistura tenha ocorrido maior formação de espuma. Silva (2013) também relatou que a maior parte do biossurfactante produzido estava na espuma, ao invés do seio do líquido no sistema reacional.

Observou-se que a variação da agitação e aeração no sistema reacional não causou uma variação tão significativa na produção de biossurfactante. A maior produção de surfactina ocorreu na condição de 200 rpm e 1 L.min⁻¹, que foi de aproximadamente 120 mg.L⁻¹ em 24 horas de cultivo, sendo este um resultado pouco satisfatório.

A baixa produção de biossurfactante apresentada pela cepa ICA56 pode ser consideravelmente aumentada se outras configurações do sistema reacional forem utilizadas. Estudos recentes (FAHIM *et al.* 2013; COUTTE *et al.* 2013) apontam que biorreatores com configuração clássica (tanque aerado) não são adequados para a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos, devido à formação excessiva de espuma durante o processo.

Segundo Henkel *et al.* (2012), devido a agitação e aeração constante durante o cultivo das cepas produtoras de biossurfactantes, ocorre a excessiva formação de espuma que afetar diretamente os rendimentos de produção. Estudos tem sido realizado visando a aeração e agitação em biorreatores, sem que ocorra formação considerável de espuma. Lee *et al.* (2008) mostraram que o uso de agentes antiespuma também não é adequado, pois estas substâncias podem causar algum efeito sobre o micro-organismo, além da possibilidade de interação com o biossurfactante produzido, implicando em um processo mais complexo de purificação.

Algumas configurações reacionais para produção de biossurfactante do tipo lipopeptídeos são apresentadas como promissoras. Coutté *et al.* (2010) utilizaram reator de membrana aerado sem bolhas e observaram produção de 600 mg.L⁻¹ de biossurfactante do tipo lipopeptídeos. Chtioui *et al.* (2012) utilizaram reator de biofilme com disco rotativo para produção de surfactina por cepa de *Bacillus sp.* e relataram produção de aproximadamente 1000 mg.L⁻¹. Fahim *et al.* (2013) utilizaram reator trifásico de fase inversa de leito fluidizado e produziram cerca de 2000 mg.L⁻¹ de surfactina bruta.

4. CONCLUSÃO

Dentre as condições analisadas, observou-se que a variação da agitação e aeração em biorreator de bancada foi apresentado como fator significativo na produção de biossurfactante pela cepa ICA56, mostrando que a condição operacional de 200 rpm de agitação e 1 L.min⁻¹ de aeração foi a melhor, dentre as avaliadas, para a produção de biossurfactante, em torno de 100 mg.L⁻¹ deste bioproduto. Este resultado sugere que outras configurações reacionais devem ser analisadas para produção de biossurfactante pelo micro-organismo em estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANI, H.; MERHNIA, M. R.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; SOUDI, M. R. Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 162, p. 510–523, 2010.

BARRETO, R. V. G., Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solos de manguezais, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) Universidade Federal do Ceará, 2011.

CHTIOUI, O.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; DHULSTER, P.; NIKOV, I. Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production, Process Biochemistry, v. 48, p. 2020-2024 2012.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. Proc. Biochem., v. 41, p. 483 – 488, 2006.

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; YAHIA, S. A.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor, Appl Microbiol Biotechnol, v. 87, 2010, p. 499-507, 2010.

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, P.; DHULSTER, P.; New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor, Process Biochemistry, v. 48, p. 25-32, 2013.

DORAN, P.M., Bioprocess Engineering Principles, Academic Press London, 1995.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21, Bioresource Technology, v. 126, p.1-6, 2012.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. Biochemical Engineering Journal, v. 76, p. 70–76, 2013.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production

by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor, *Biotechnology Journal*, v. 4, p. 738–747, 2009.

HENKEL, M; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, v. 47(8) p. 1207-1219, 2012.

LEE, B. S.; KIM, E. K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 639-647, 2008.

LIMA, L. B., Frequência de bactérias produtoras de biosurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

NEVES, L. C. M. Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181. Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto – SP, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bior. Tech.*, v. 97, p. 336-341, 2006.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci*, v. 12, p. 633-654, 2011.

RAMKRISHNA, S. Biosurfactants. Springer Science & Business Media, 2010.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, v. 01, p. 1-370, 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*, ed.1, v. 2, p. 539, 2001.

SILVA, D. P.; PESSOA, A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 91, p. 605-613, 2001.

SILVA, M. T. S. Produção e concentração integrada de surfactina a partir de *Bacillus* sp ITP-001 em fracionamento com espuma em semi-batelada. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

YEH, M. S.; WEI, Y. H. CHANG, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1799-1805, 2006.