

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC (9372) A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

M. G. MARIM¹, M. V. S. LIMA¹, E. BONA¹

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Faculdade de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: mariliagato1@gmail.com

RESUMO – Biossurfactantes são moléculas anfífilas com aplicações industriais, que podem ser obtidas através de processo fermentativo realizado por microrganismos. Devido à crescente preocupação com o ambiente muitas pesquisas vêm sendo realizadas objetivando a obtenção de produtos e processos menos poluentes, bem como, a busca por soluções viáveis economicamente através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do pH; concentração inicial de inóculo; e suplementação na obtenção de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) empregando solução aquosa de melaço de cana-de-açúcar, clarificada, como meio de cultura. Para tanto, foi elaborado um planejamento experimental Box-Behnken para avaliar o efeito da suplementação, pH e quantidade de inóculo sobre a quantidade de biossurfactante e biomassa produzida durante a fermentação, conduzida sob agitação orbital de 150 rpm por 144 horas, à 35°C. O biossurfactante obtido foi recuperado através da precipitação com solvente metanol. Para quantificar a biomassa e o biossurfactante produzido em cada experimento empregou-se o método gravimétrico. Os resultados mostraram que o processo fermentativo estudado sofreu influência positiva, dentro da faixa estudada, com aumento de biomassa e biossurfactante em relação à suplementação ao nível de 1%, pH 7 e 1% de inóculo inicial de *Bacillus subtilis*.

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfífilas ou anfipáticas, contendo duas frações distintas: apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). Por esta razão, os surfactantes possuem a capacidade de interagir com líquidos de diferentes características como misturas apolares e polares e formar na superfície uma película ou filme, capaz de reduzir a tensão superficial na interface líquido/ar (Zana, 2005). De acordo com Sobrinho (2007), essas características conferem aos surfactantes diversas possibilidades de aplicação para uso doméstico ou industrial, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases.

Fonseca *et al.* (2007) esclarece que os surfactantes mais usados atualmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo, embora o interesse em biossurfactantes de origem microbiológica, tenha aumentado nos últimos anos devido à sua biodegradabilidade e

baixa toxicidade. Porém, a produtividade e a estrutura química de um biossurfactante não dependem apenas do microrganismo utilizado, visto que, o crescimento microbiano é bastante afetado pela fonte de carbono, elementos vestigiais, temperatura, oxigênio e pH; promovendo mudanças na estrutura química da molécula, e, conseqüentemente, alterando suas características físico-químicas e aplicação (Cara, 2009).

A literatura apresenta uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos capazes de produzir biossurfactantes com grande diversidade estrutural, porém a maioria é produzida por bactérias. Determinadas espécies do gênero *Bacillus* são avaliadas pela sua capacidade de produzir compostos com propriedades tensoativas, como a surfactina, produzidas por *Bacillus subtilis*, caracterizada como um dos mais potentes biossurfactantes já conhecidos (Nitschke e Pastore, 2006).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar, através de um planejamento experimental, a influência de três variáveis de processo (pH, concentração de inóculo inicial e porcentagem de suplementação) na obtenção de biossurfactante, empregando fermentação em batelada por *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) em solução aquosa de melaço de cana-de-açúcar clarificado como meio de cultura.

2. METODOLOGIA

Uma solução de melaço de cana-de-açúcar (100 g/L) clarificada foi utilizada como meio de cultura. A clarificação da solução de melaço foi realizada segundo metodologia descrita por Valduga (2005), e caracterizada através de análises de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), pH e teor de sólidos solúveis (°Brix), de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

A bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 9372 (*Bacillus atrophaeus* var. *subtilis*) utilizada para obtenção do biossurfactante foi cedida pela empresa Clean-up Brazil Biotecnologia. A bactéria foi ativada e propagada em caldo nutriente para antes do uso na fermentação.

Para avaliar a influencia das variáveis de processo: pH, concentração inicial de inóculo e suplementação (extrato de levedura e peptona) na produção do biossurfactante e da biomassa empregou-se a técnica de planejamento experimental Box-Behnken para estes três fatores de estudo, utilizando dois níveis, superior (+1) e inferior (-1) e um ponto central (0), para cada fator. Os níveis reais e codificados estão apresentados na Tabela 1. Todos os ensaios do planejamento foram realizados aleatoriamente. As respostas avaliadas (variáveis dependentes) foram aumento de biomassa (g/L) e biossurfactante (g/L).

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento

VARIÁVEIS		Níveis reais e codificados		
		-1	0	1
X1	pH da reação	5,0	6,0	7,0
X2	Inóculo (% V/V)	1,0	1,5	2,0
X3	Suplementação (% m/V)	0	0,5	1,0

Toda análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.1 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Para avaliar o efeito das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes (respostas) a metodologia de superfície de resposta foi aplicada; e a análise de variância foi utilizada para avaliar a adequação dos modelos que foram ajustados a partir da Equação 1.

$$y(X_1, X_2, X_3) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (1)$$

Onde y é a resposta prevista, β_0 é uma constante, β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os coeficientes da regressão e X_1 , X_2 , X_3 são os níveis das variáveis independentes.

Os experimentos foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio de cultura composto pela solução aquosa de melaço clarificado na concentração 100 g/L. O meio de cultura foi inoculado, com a solução de inoculo contendo $6,7 \times 10^8$ UFC/mL de *Bacillus subtilis*, ajustado o pH e adicionado os suplementos (extrato de levedura e peptona) de acordo com o planejamento experimental proposto. Para determinação de biomassa inicial (massa seca) foi retirada uma amostra de 10 mL e após os frascos foram mantidos fechados sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à 35°C em Banho Termostático Agitado MOD-DI – 950 M.

A determinação de biomassa seca foi realizada no início e ao término da fermentação. Além da quantificação da biomassa e do biossurfactante produzido também foram feitas leituras de pH ao término da fermentação.

O biossurfactante produzido durante as fermentações foi recuperado do caldo fermentado segundo a metodologia sugerida por Sobrinho (2007), onde o caldo fermentado foi centrifugado (4500 rpm) por 20 minutos, então o sobrenadante teve seu pH ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 mol/L e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso por 24 horas à 0°C, foi centrifugado (4000 rpm) por 30 minutos, e o precipitado foi lavado duas vezes com metanol gelado e então seco em estufa a 37°C por 48 horas, o biossurfactante seco foi pesado; e calculou-se a quantidade de biossurfactante obtido para cada experimento em g/L.

3. RESULTADOS

Os resultados das determinações analíticas de °Brix; AR; ART do caldo foram de 8 °Brix, 5,5 g/L, 23,21 g/L, respectivamente, confirmando concentrações adequadas para suprir as necessidades dos microrganismos durante o processo fermentativo e contribuindo com o aumento de biomassa e produção do biossurfactante.

Ao analisar a tabela 2, observa-se que o pH diminuiu em todos os experimentos mantendo-se numa faixa de pH final de 4 a 4,5, o que também foi observado por Ciapina (2008) e Pirog et al. (2004). Essa acidificação é causada devido ao melaço de cana-de-açúcar propiciar a formação de outros metabólitos pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, como ácidos orgânicos, que alteraram o pH do meio.

A Tabela 2 também apresenta a matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como, as respostas obtidas para o aumento da biomassa e biossurfactante, e pH final.

Tabela 2 – Respostas da matriz de planejamento Box-Behnken

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	pH final	Aumento de Biomassa (g/L)	Biossurfactante (g/L)
1	-1 (5,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	4,4	1,09	1,08
2	+1 (7,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	4,16	1,21	1,20
3	-1 (5,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	4,19	1,31	1,39
4	+1 (7,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	4,2	1,12	1,32
5	-1 (5,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	4,15	1,21	1,55
6	+1 (7,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	4,37	1,29	2,07
7	-1 (5,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	4,34	2,19	3,54
8	+1 (7,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	4,46	2,11	3,65
9	0 (6,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	4,41	1,37	1,27
10	0 (6,0)	+1 (2,0)	-1 (0,0)	4,75	1,08	1,17
11	0 (6,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	4,47	2,26	2,78
12	0 (6,0)	+1 (2,0)	+1 (1,0)	4,29	1,71	2,93
13	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	4,28	1,41	1,77
14	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	4,22	1,41	1,77
15	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	4,3	1,36	1,77

^apH da reação.

^bInóculo (% V/V).

^cSuplementação (% m/V).

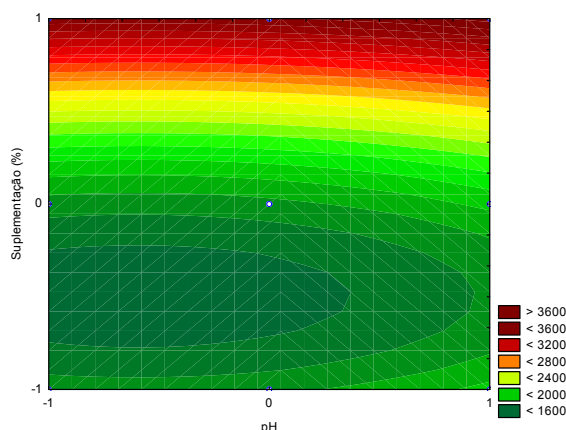
De acordo com os coeficientes de regressão para a resposta biomassa (g/L) as variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), com exceção do pH. Porém, apenas a suplementação teve efeito positivo sobre a resposta, ou seja, maiores valores de biomassa foram observados quando a suplementação estava no nível superior (+1).

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a Equação 1, que representa o modelo quadrático da biomassa em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA). O $F_{\text{calculado}}$ da regressão apresentou-se significativo (0,001088), sendo maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 87\%$), podendo assim, concluir que o modelo (Equação 2) ajustou-se bem aos dados experimentais.

$$Biomassa (g/L) = 1389,81 - 7,14 X_1 - 89,29 X_2 + 417,14 X_3 - 148,83 X_2^2 + 364,02 X_3^2 - 76,43 X_{12} - 65,00 X_{23} \quad (2)$$

Ao analisar os resultados da Tabela 2 referente às respostas de Biossurfactante (g/L) juntamente com os coeficientes de regressão, nota-se que o efeito da suplementação, pH e interação inóculo com suplementação ($x_2 \cdot x_3$) foram positivos, afirmando que quando usados no nível superior aumentam a produção de biossurfactante. Assim, a máxima produtividade de biossurfactante foi constatada com 1% (+1) de suplementação, pH ajustado para 7 (+1) e 1% (-1) de inóculo de *Bacillus subtilis*, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Curva de contorno para o biossurfactante com concentração de inóculo fixa no ponto central.



Considerando os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a Equação 3, que representa o modelo quadrático de biossurfactante em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA). O $F_{\text{calculado}}$ da regressão apresentou-se significativo (0,000075), sendo maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 98\%$), podendo assim, concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

$$\text{Biossurfactante (mg/L)} = 1770,71 + 85,00X_1 + 60,54X_2 + 860,89X_3 + 71,25X_1^2 - 592,68X_2^2 + 860,89X_3^2 - 47,14X_{12} - 1$$

(3)

Torna-se interessante ressaltar que, as melhores condições para o desenvolvimento do microrganismo e produção de biossurfactante, foram as que tiveram a adição de suplementação e ficaram na faixa do pH neutro ou pH 7. Observa-se que a concentração de biossurfactante variou de 3,65 a 1,08 g/L (ensaios 8 e 1). Essa faixa de resultados referente ao biossurfactante obtido pode ser considerada adequada, visto que Penna et. al (2014), avaliou a produção de biossurfactantes a partir do cultivo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e *Bacillus subtilis* W1012 (GFP uv) em meio TSB (Tryptone Soy Broth) e alcançou produção de 0,40 g/L e 0,50 g/L respectivamente. Pode-se notar que nas condições estudadas o processo fermentativo proporcionou alta concentração de biossurfactante quando comparado ao trabalho de Penna et. al. para o mesmo microrganismo. -Em relação ao meio composto por melaço suplementado com extrato de levedura e peptona, este teve influência positiva e foi capaz de promover o crescimento do microrganismo e produção do biossurfactante.

4. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem viabilidade técnica para produção de biossurfactante a partir de resíduos agroindustriais, como o melaço de cana de açúcar, e do *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) como biocatalisador do processo. Pode-se concluir que o processo fermentativo estudado sofreu influência positiva em relação à suplementação com peptona e extrato de levedura ao nível de 1% (+1), pH 7 (+1) e 1% (-1) de inóculo inicial de *Bacillus subtilis*, dentro da faixa estudada. Vale salientar que o fator suplementação favoreceu tanto o aumento da biomassa quanto a produção de biossurfactante.

5- REFERÊNCIAS

CARA, D. V. C. *Produção de biossurfatante por flavobacterium sp. a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial*. 2009. 71 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2009.

CIAPINA, E. M. P. *Produção de Biossurfactante por Rhodococcus erythropolis em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2008.

FONSECA, R. R. et al. Optimizing Carbon/ Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Rio de Janeiro, v. 136- 140, p. 471- 486, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3 ed. São Paulo: IMESP, p. 157, 1985.

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

PENNA, T. C. V. et al. *Avaliação da Produção de biossurfactantes a partir do cultivo de Bacillus atrophaeus ATCC 9372 e Bacillus subtilis W1012 (GFP uv) em meio TSB (Tryptone Soya Broth)*. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

PIROG, T. P.; SHEVCHUK, T.A.; VOLOSHINA, I. N. AND KARPENKO, E. V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, p. 544-550, 2004.

SOBRINHO, H. B. S. *Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por Candida sphaerica*. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

VALDUGA, E. *Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por Sporodibolus salmonicolor CBS 2636*. 2005. 189 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

ZANA, R. *Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, micro emulsions, vesicles, and lyotropic phases*. (Surfactant science series; v. 125) New York: CRC Press, 2005. 539. Disponível em: < <http://migre.me/kmIz6> > Acesso em: 22 mai.2014