

## **Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b por Fermentação em Estado Sólido (FES) para a Produção de Biossurfactantes**

**Juliana Barion Massi<sup>1</sup>; Maria Inês Rezende<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 Londrina-PR E-mail: juliabarion@gmail.com

### **RESUMO**

A agroindústria constitui um dos principais segmentos da economia brasileira que gera grande variedade e quantidade de resíduos, fonte rica de compostos bioativos, o seu reaproveitamento diminui o impacto ambiental e causa ganhos econômicos. Esta utilização pode ser possível através da fermentação em estado sólido, que aproveita os sólidos provenientes da agroindústria para realizar o crescimento microbiano, com produção de enzimas e outros metabólitos. O objetivo deste estudo foi verificar o crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b nos resíduos, farelo de soja, farelo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. Conhecida a composição centesimal de cada resíduo foi possível determinar a relação C/N, e a sua influencia no crescimento microbiano, que foi determinado (UFC/mL) e visualizado por MEV. E por esses métodos foi possível verificar o desenvolvimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em todos os resíduos estudados, confirmando seu potencial para o cultivo em FES e sua utilização no aproveitamento de resíduos agroindustriais.

**Palavras-chave:** Fermentação em Estado Sólido; Biossurfactantes; *Bacillus*, Substratos Lignocelulósicos

### **INTRODUÇÃO**

A região Sul do Brasil é caracterizada pela economia com base na agricultura, que, gera quantidades consideráveis de resíduos sólidos e líquidos, desde a extração da matéria prima, até o processamento industrial e, sem alternativa de destino final definido podem ser causadores de graves problemas ambientais<sup>1</sup>. Nos últimos anos alternativas biotecnológicas vem sendo avaliadas como tentativa de tornar eficiente a utilização dos resíduos, pois sendo substâncias naturais compreendem uma fonte rica de compostos bioativos, o seu uso pode diminuir o impacto ambiental e ainda agregar valor a muitos produtos<sup>2</sup>.

A fermentação em estado sólido aproveita os resíduos sólidos provenientes da agroindústria para o crescimento microbiano, neste contexto, ocorre a síntese de diversos compostos, muitos de grande interesse industrial e de elevado valor agregado como as enzimas e outros diferentes metabólitos<sup>3</sup> como os biossurfactantes. Este processo fermentativo consiste no crescimento de microrganismos sobre partículas porosas úmidas, sem a presença de água livre que deve estar intimamente ligada à fase sólida<sup>4</sup>. Grãos de arroz, raízes de mandioca, farelos de soja, de arroz ou trigo, cascas de trigo ou de arroz, entre outros subprodutos processados ou agrícolas podem ser utilizados como substratos para fermentação em estado sólido<sup>5</sup>. Estes apresentam características estruturais comuns sendo constituídos de amido, celulose, pectina, lignina entre outros polímeros. Este tipo de substrato tem encontrado grande

importância no processo de fermentação em estado sólido, pois fornecem os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

O gênero *Bacillus* apresenta elevado potencial biotecnológico<sup>6</sup>, possui elevada taxa de crescimento e grande capacidade de excretar metabólitos para o meio extracelular, estas características conferem a este gênero, potencial de aplicação junto aos setores industriais<sup>7</sup>. Entre os diversos metabólitos secundários produzidos por esta espécie, estão os biossurfactantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b, nos resíduos de farelo de soja, farelo de milho, casca de arroz e bagaço de cana de açúcar, visando a produção de biossurfactantes.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

1-MICROGANISMO: O microrganismo utilizado foi o *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b isolado e identificado por Granzotto<sup>8</sup> e mantida em meio sólido de Dyg's repicada a cada três meses.

2-COMPOSIÇÃO CENTESIMAL: Teor de umidade<sup>9</sup>: as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C até peso constante; Proteínas<sup>9</sup>: foi utilizado o método semimicro-Kjeldahl<sup>9</sup> para a determinação do nitrogênio total das amostras e utilizou-se o fator 6,25 para a conversão deste em proteína total; Lipídeos totais<sup>9</sup>: foi utilizado o método de Soxhlet, o solvente utilizado foi o éter etílico, retirado em rotaevaporador e os lipídeos determinados por gravimetria; Cinzas<sup>9</sup>: as amostras foram queimadas em bico de Bunsen e levadas a mufla na temperatura de 550 °C por 24 horas e os Carboidratos Totais<sup>9</sup>: A medida dos carboidratos totais<sup>9</sup> foi feita por análise de diferença.

3-PREPARO DO INÓCULO: A bactéria foi transferida asepticamente do meio de manutenção para Erlenmeyers de 50 mL, contendo uma solução de sais<sup>10</sup>, adicionada de 0,02 g % de glucose como fonte de carbono. Os frascos foram incubados por 24 horas a 28 ± 2°C e 180 rpm, 200 µL (4.10<sup>8</sup> UFC/mL) da suspensão de células foi utilizada como inóculo para os cultivos.

4-FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: Os cultivos sólidos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL, contendo 1,5 g de cada resíduo (bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, farelo de soja e farelo de milho), estabelecida a umidade de 87 %, 87 %, 88 % e 76 %, respectivamente, com adição de solução de sais<sup>10</sup> como solução umedecedora. Os frascos foram inoculados com 200 µL de suspensão de células (4.10<sup>8</sup> UFC/mL) e mantidos por 48 horas a 28 ± 2 °C.

5-INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS E OBTENÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS (ELC): A interrupção dos cultivos foi feita pela adição de 10 mL de água destilada e os frascos foram agitados à 180 rpm, 30 min. Para a recuperação do ELC, o material foi centrifugado à 10.000 rpm, 20 min., 4 ± 2 °C.

6-CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC): A partir dos ELC foram feitas diluições seriadas de 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-9</sup>, em salina fisiológica, para cada uma das diluições 100 µL foram plaqueados em meio Dyg's e incubadas por 24 horas, 30 °C.

6-DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO: Para verificar o índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>) utilizou-se a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987) com algumas alterações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada um dos resíduos estudados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal dos resíduos foi feita para se conhecer as relações C/N, onde os elementos do carbono são utilizados como fonte de energia para que ocorra assimilação do nitrogênio. Existe uma influência significativa na utilização desses resíduos pelo microrganismo. O crescimento microbiano em fermentação em estado sólido tem forte correlação com as quantidades de carbono/nitrogênio disponíveis. Estes resultados são apresentados na Tabela 1 e a partir deles foram determinadas as relações C/N para o farelo de soja (FS) 1:3; farelo de milho (FM) 1:19,5; casca de arroz (CA) 1:19,5 e bagaço de cana de açúcar (BC) 1:30,5.

**Tabela 1:** Composição centesimal dos resíduos agroindustriais

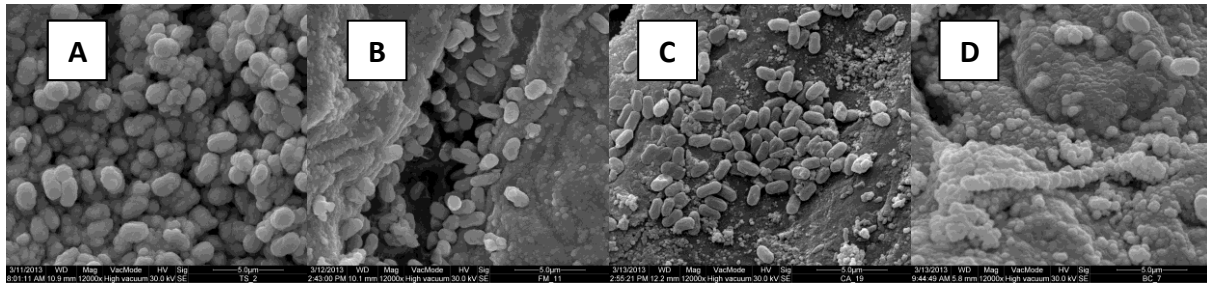
	Umidade	Cinzas	Lípidos	Proteínas	Carboidratos	UFC/mL
<b>Farelo de soja</b>	24 %	4 %	5 %	47 %	14 %	7.10 <sup>8</sup>
<b>Farelo de milho</b>	26 %	2 %	12 %	2 %	39 %	8.10 <sup>8</sup>
<b>Casca de arroz</b>	22 %	14 %	12 %	2 %	39 %	3.10 <sup>8</sup>
<b>Bagaço de Cana de Açúcar</b>	22 %	2 %	7 %	2 %	61 %	3.10 <sup>8</sup>

O crescimento microbiano foi determinado nesses substratos após 4 dias de cultivo quando foram interrompidos pela adição de salina estéril aos fermentados e estas soluções foram diluídas e plaqueadas em meio Dyg's de onde foram contadas as unidades formadoras de colônias UFC/mL (Tabela 1). A avaliação desses resultados mostrou que o *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b foi capaz de crescer em todos os substratos onde no farelo de soja e no farelo de milho o crescimento foi de aproximadamente 7.10<sup>8</sup> UFC/mL e na casca de arroz e no bagaço de cana de açúcar de aproximadamente 3.10<sup>8</sup> UFC/mL confirmando que este microrganismo foi capaz de utilizar as fontes de carbono e nitrogênio contidas nos resíduos, mesmo que essas contenham proporções tão diferenciadas desses nutrientes.

Para todos os ELC obtidos foram também determinados o índice de emulsificação IE<sub>24</sub> como teste qualitativo para a produção de biossurfactantes, mas devido à complexidade dos substratos este teste apresentou interferentes e não foi possível determinar a porcentagem de emulsão formada entre as amostras controle e cultivos. Sendo desta forma requerido outro método para esta verificação.

A partir dos substratos fermentados foram preparadas amostras para microscopia eletrônica de varredura (Figura 1). Os resultados mostram que o microrganismo foi capaz de se desenvolver nos substratos sob condição de fermentação em estado sólido (FES).

Figura 1: Eletromicrografias de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b cultivado nos substratos: farelo de soja umidade 87 % (A); farelo de milho, umidade 76 % (B); casca de arroz, umidade 87 % (C) e bagaço de cana de açúcar, umidade 87 % (D), aumento 12.000X



## CONCLUSÕES

O farelo de soja foi o substrato com maior proporção de proteínas e o bagaço de cana de açúcar o substrato com maior proporção de carboidratos. A partir da composição centesimal dos resíduos, foi possível determinar as relações C/N para esses substratos (FS 1:3; FM 1:19,5; CA 1:19,5 e BC 1:30,5, mas não foi possível estabelecer uma correlação direta entre maior ou menor relação C/N com o crescimento do microrganismo. No farelo de soja e no farelo de milho o crescimento foi duas vezes maior que nos substratos casca de arroz e bagaço decana de açúcar. A composição dos substratos dada pela composição centesimal e os resultados de crescimento em UFC/mL sugerem para próximos experimentos a mistura desses substratos como forma de adequar a relação C/N para o crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b e consequente produção de biossurfactantes.

## REFERÊNCIAS

- (1) SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHER, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, V.13, p.205-218, 2003.
- (2) LAUFENBERG, G., 2003. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, 87, pp.167-198
- (3) PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V.13, n.2/3, p. 81-84, 2003
- (4) RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.
- (5) MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation**. V.1, ed.1, Heidelberg: Springer, p.450, 2006.
- (6) GORLACH-LIRA, K.; PEDROZA, M.L.V.; BURDZIEJ-POKOJSKA, A.; ROZYCKI, H.; DAHM, H. Response surface analysis on the effect of temperature and pH on growth and proteolytic activity of thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.5, Curitiba, Set/Out 2010.
- (7) SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.1, p.1-17, 2004.
- (8) GRANZOTTO, G.A.; MARCELINO, P.R.F.; BARBOSA, A.M.; RODRIGUES, E.P.C.; REZENDE, M.I.; OLOVEIRA, A.L.M. Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: Identification of oil eating *Bacillus* strains. **Annals of Microbiology**, 2011.
- (9) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, p. 523, 1985.
- (10) CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídios por fermentação em estado sólido**. 2010, 156p. tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.