

ISOLAMENTO DE BIOSURFACTANTES E HIDROLASES A PARTIR DO CRESCIMENTO DE *Bacillus sp.*

Daniel Beretta^{1*}, Augusto Etchegaray Júnior²

1. Estudante de IC da Fac. de Química da PUC-Campinas

2. PUC-Campinas - Faculdade de Química / Orientador

Resumo:

Os microorganismos vivem em praticamente toda a terra, bactérias como o *Bacillus sp.* podem ser extremamente úteis como fonte de enzimas e biossurfactantes. Estes são produtos químicos finos e ambientalmente corretos com variada aplicação comercial. **Através do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* 0G, buscou-se isolar hidrolases e biossurfactantes, utilizando várias técnicas de separação.** Para avaliação foram usados métodos colorimétricos adaptados. Os resultados indicam que a linhagem produz 244mg/L de surfactina em 72h de crescimento nas condições testadas e também produz hidrolases. O melhor método de separação foi a precipitação por *salting-out* com adição de etanol. O método de *salting-out* sem etanol preserva a atividade enzimática mas apresenta menor recuperação de surfactina.

Palavras-chave: *Bacillus*; Biossurfactantes; Hidrolases.

Apoio financeiro: FAPESP (2013/20570-6) e PIBIC-CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: PUC-Campinas.

Introdução:

Os microrganismos são um grande grupo de seres vivos que vivem em praticamente todos os locais da Terra. Seu desenvolvimento é facilitado a partir da produção de metabólitos secundários, que são biomoléculas diferenciadas, muitas das quais hoje são utilizadas como medicamentos [1,2].

Bacillus sp. é um gênero de bactérias gram-positivas, aeróbias, em forma de bastão e formadora de endosporos. Comumente encontradas no solo, na água ou em associação com plantas, algumas cepas tem um sistema secretório muito desenvolvido, produzindo desde toxinas até antibióticos [3,4]. O *B. subtilis* e espécies correlatas como *B. amyloliquefaciens* são alguns dos microorganismos mais estudados e são conhecidos pela sua produção industrial de

enzimas, vitaminas, antibióticos e outros produtos químicos como os biossurfactantes [4].

Os biossurfactantes são compostos que apresentam ótima atividade superficial, atividade biológica e são biodegradáveis [5,6]. No caso de *Bacillus*, eles são do tipo lipopetídeos, dispostos em várias famílias como as fengicinas e iturinas, porém as de maior valor comercial são as surfactinas [5].

A surfactina é um peptídeo não ribossômico, sendo constituída de aminoácidos dispostos em cadeia cíclica, ligados a um ácido graxo β -hidroxilado de cadeia carbônica variável. As propriedades da surfactina permitem a aplicação segura desse composto na indústria de alimentos, cosméticos, fármacos, medicina, agricultura e na remediação ambiental [5,6,7].

As enzimas por sua vez, são biocatalizadores, sendo que das mais de 3000 enzimas conhecidas, apenas 5% tem uso comercial, principalmente as hidrolases como esterases, proteases e glicosidases [8,9].

A produção de biossurfactantes tem como desafio a baixa produtividade, o alto custo da matéria prima e a dificuldade nos processos de purificação [10]. A substituição dos substratos por opções de baixo custo como resíduos agrícolas são alternativas baratas e ecologicamente corretas [11]. Métodos de separação simples e largamente aplicados na indústria como a floculação e a precipitação por adição de sal (*salting-out*) apresentam potencial para a redução dos custos de separação e posterior purificação dos biossurfactantes [7,12,13].

O objetivo deste trabalho foi identificar e separar biossurfactantes e hidrolases, a partir do cultivo de *Bacillus* em meio de Landy modificado - visando o aproveitamento das enzimas e a redução de custos com etapas de separação e purificação.

Metodologia:

Para o desenvolvimento do trabalho foi realizado cultivo em meio de Landy modificado [14]. Neste meio são adicionados macronutrientes (glicose e ácido glutâmico), micronutrientes e extrato de levedura. Glicerol foi usado juntamente com a glicose para deixar

o meio mais sustentável, pois este é resíduo da produção de biodiesel. Para manter o pH do meio, foi adicionado tampão MOPS.

Foi feito um pré-inóculo em erlenmeyers previamente autoclavados, adicionando-se um estoque de glicerol a 10mL do meio formulado e mantido em estufa a 30°C sob agitação (220rpm) por 20 horas. Posteriormente o pré-inóculo foi transferido para frascos maiores contendo 125mL de meio de cultura e, novamente foram mantidos na estufa a 30°C e 220rpm durante 72 horas. Alíquotas foram retiradas durante as primeiras 24h e 48h. Para separar a biomassa do extrato livre contendo biosurfactantes, foi feita centrifugação (8.965g) em tubos Falcon de 50 mL. O sobrenadante foi então armazenado em geladeira para uso posterior.

Para precipitar e remover proteínas do sobrenadante bruto foi realizada a adição de sulfato de amônio até 25% [13], o precipitado foi recolhido por centrifugação e então foi continuada a adição de sulfato de amônio até 50%. Foram recolhidos o sobrenadante a 50% e os precipitados a 25% e 50% [13]. O precipitado de 25% foi lavado com etanol e ressuspenso em tampão Tris.HCl (pH 7,5). Em seguida foi realizada diálise no mesmo tampão para remoção do sulfato de amônio.

No segundo método de separação foi adicionado etanol a 33% ao sobrenadante bruto, em seguida foi adicionado o sulfato de amônio. Após a adição do sal a mistura perde sua solubilidade e se separa em fases distintas. Então a mistura foi colocada em funil de separação, separando-se a fase aquosa e a fase alcóolica [12].

Para a floculação, foi adicionado etanol até 40% ao sobrenadante bruto, em seguida foram adicionados os flocculantes Na_2HPO_4 e CaCl_2 . A mistura teve pH ajustado e foi mantida a 35°C, em seguida foi centrifugada (8.965g) para retirar-se o precipitado [7].

Para testar a presença de enzimas foram realizados ensaios colorimétricos qualitativos de detecção direta, com substratos específicos para alfa-amilase, serino-proteases e esterases, com incubação a 37°C e leitura a 405nm em leitora de microplacas.

Surfactina foi detectada por testes colorimétricos de detecção direta, em leitora de microplacas a 492nm, usando método adaptado com fluoresceína [15].

Resultados e Discussão:

Foi realizada a quantificação nas alíquotas sem tratamento de 24h, 48h e 72h, para acompanhar a produção de surfactinas. Foi feita uma curva de calibração com surfactina padrão a 80% de pureza e a

absorbância das amostras foi determinada. Com a equação da reta foram calculadas as concentrações nas amostras (Tabela 1).

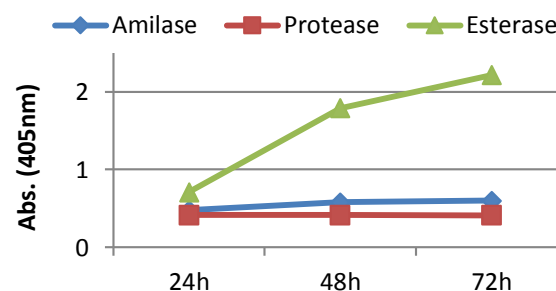
Tabela 1. Monitoramento da produção de surfactinas.

Amostra	Absorbância (492nm)	[Surfactina] (mg/L)
24h	0,111	233
48h	0,122	242
72h	0,238	338

A concentração de surfactina aumentou gradualmente com o tempo de cultivo, exibindo maior aumento de 48h para 72h.

Também foram feitos testes enzimáticos nas mesmas alíquotas, para acompanhar a produção. O tempo de incubação foi de 5min para esterase e 30min para protease e alfa-amilase, a 37°C (Gráfico 1).

Gráfico 1. Monitoramento enzimático



Observando o Gráfico 1, verifica-se que a produção de esterases aumenta com o tempo de cultivo, já as proteases e alfa-amilase permanecem relativamente estáveis.

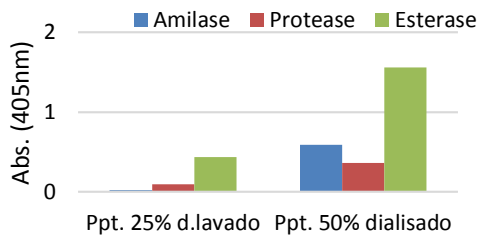
Para o primeiro método de separação, foram feitos testes comparando-se os precipitados dialisados obtidos a 25% e a 50% de sulfato de amônio, e o efeito da lavagem com etanol. Para a quantificação foi feita uma curva de calibração com surfactina padrão a 80% de pureza. A equação da reta obtida ($R^2=0,994$) foi usada para calcular a concentração de surfactina nas amostras. Os resultados da Tabela 2 indicam que a lavagem com etanol retira a maior parte da surfactina do precipitado.

Tabela 2. Efeito da lavagem com etanol.

Amostra	Absorbância	[Surfactina] (mg/L)
Precipitado d. lavado 25%	0,806	136
Etanol de lavagem	0,944	280
Precipitado dialisado 50%	0,953	289

Também foi realizado o ensaio enzimático das hidrolases. A reação foi feita por 18 minutos (amilase, esterase) e 40 minutos (protease) a 37°C, os resultados estão no Gráfico 2.

Gráfico 2. Tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Conforme visto no Gráfico 2, o tratamento aplicado até 25% precipita parcialmente as esterases, já a 50% de sulfato de amônio todas as enzimas precipitam.

Para a quantificação da surfactinas nos diversos métodos de separação realizados, foi feita uma curva de calibração com surfactina padrão a 80% (Gráfico 3). Também foi calculado o desvio padrão do branco ($S=0,011$) e os limites de detecção e quantificação dessa curva ($LD=38\text{mg/L}$, $LQ=116\text{mg/L}$), a média de absorbância do branco ficou em 1,048. Como as amostras não foram corrigidas pelo branco, a equação da reta usada para quantificação foi obtida sem subtrair o valor do branco ($R^2=0,982$). Os resultados das amostras e a concentração calculada encontram-se no Gráfico 4.

Gráfico 3. Curva de calibração

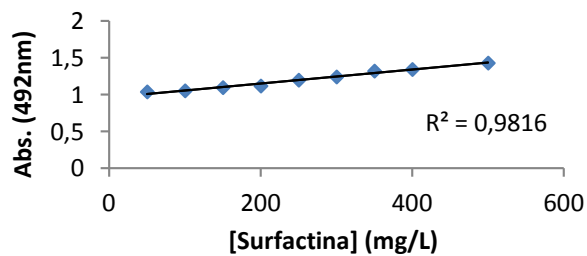
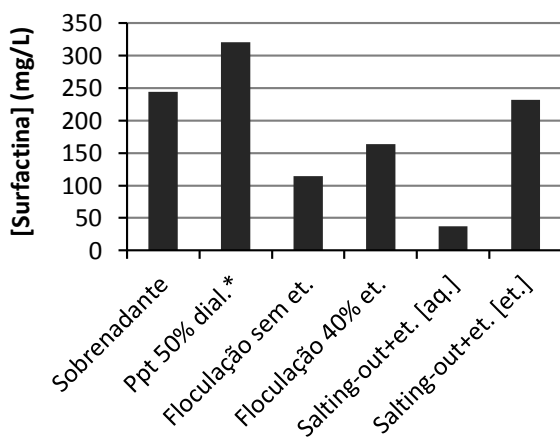


Gráfico 4. Comparação dos métodos.



*Volume concentrado

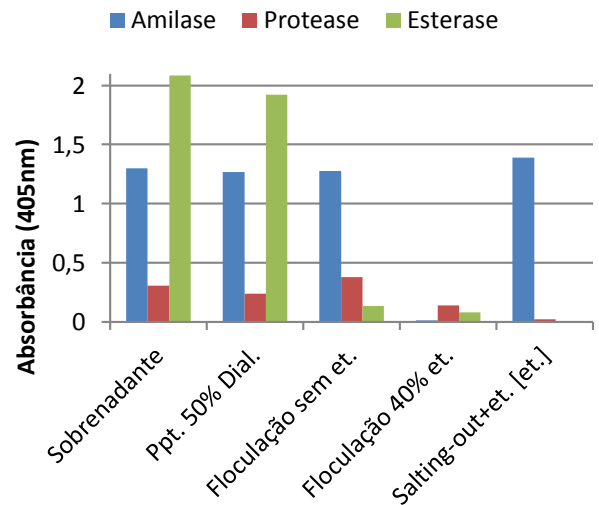
Foram testados o sobrenadante bruto, o precipitado a 50% seguido de diálise, a floculação sem etanol e com etanol 40%, o *salting-out* com etanol nas fases aquosa e alcoólica.

Observando os dados, percebe-se que a maior recuperação de surfactina encontra-se na fase alcoólica do tratamento por *salting-out* com adição de etanol, com concentração próxima ao sobrenadante bruto.

A técnica de floculação é um pouco menos eficiente e sem adicionar etanol os rendimentos são menores. O precipitado a 50% dialisado (*salting-out* sem etanol) teve volume concentrado e por isso não pode ser comparado diretamente com os outros, entretanto sua eficiência aparenta ser aproximadamente comparável à floculação, com a vantagem de não degradar as enzimas coproduzidas.

Também foram realizados testes enzimáticos nas amostras dos diversos tratamentos efetuados, a reação foi feita por 10 minutos (amilase, esterase) e 45 minutos (protease) a 37°C. Os resultados estão no Gráfico 5.

Gráfico 5. Análise comparativa da atividade enzimática.



Com base no Gráfico 5, verifica-se que o tratamento por *salting-out* sem etanol (ppt. 50% dialisado) não degrada nenhuma enzima, sendo praticamente igual ao sobrenadante bruto. A floculação sem adicionar etanol degrada apenas as esterases, já com etanol todas as enzimas são degradadas. No método de *salting-out* com etanol apenas a alfa-amilase permanece com atividade, mesmo na fase alcoólica.

Os resultados indicam que o melhor método de separação visando a coprodução de insumos é o de *salting-out* com adição de etanol, considerando-se a alta recuperação de surfactina e sua separação da alfa-amilase.

Adicionalmente, a fase alcoólica facilita a obtenção da surfactina sólida por evaporação.

Conclusões:

Através do cultivo de *Bacillus* verificamos a produção de hidrolases e biossurfactantes. Diferentes técnicas de separação foram comparadas, a melhor foi a precipitação por *salting-out* com etanol, porém as técnicas com etanol degradam a maior parte das enzimas. A técnica de *salting-out* sem etanol preserva a atividade enzimática, assim como a floculação sem etanol. O cultivo foi monitorado com sucesso pelos ensaios colorimétricos, mostrando que é possível a coprodução de mais de um insumo a partir de um único cultivo.

Referências bibliográficas

- [1] Conti, R., *et al.* (2012), Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos, **Ciência e Cultura**, vol. 64, n.3, p.43-47.
- [2] Pinto, A.C., *et al.* (2002), Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Química Nova**, vol. 25, supl.1, p.45-61.
- [3] Wang, T., *et al.* (2015), Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, n.23, p.744-754.
- [4] Goldman, E., *et al.* (2015), **Practical Handbook of Microbiology**, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- [5] Barros, F.F.C., *et al.* (2007), Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos, **Química Nova**, vol. 30, n.2, p.409-414.
- [6] Slivinski, C.T. *et al.* (2012), Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent, **Process Biochemistry**, n.47, p.1848-1855.
- [7] Zhang, D. *et al.* (2014), An efficient method for separation of surfactin from *Bacillus amyloliquefaciens* fmb50 broth by flocculation, **Process Biochemistry**, n.49, p.1182-1188.
- [8] Brahmachari, G. (2016), **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. 1st ed., Academic Press, Cambridge, Cap. 1.
- [9] Illanes, A. (2008), **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**, 1st ed., Springer Science, Berlin. Cap. 1.
- [10] Kosaric, N. *et al.* (2015), **Biosurfactants: Production and Utilization – processes, technologies, and economics**, 1st ed., CRC Press, Boca Raton. Cap. 4, 8, 9.
- [11] De Faria, A.F. *et al.* (2011), Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry, **Process Biochemistry**, n.46, p.1951-1957.
- [12] Chen, H.L., *et al.* (2008), Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process, **Separation and Purification Technology**, n.59, p.244-252.
- [13] Arifin, A.R., *et al.* (2013), Isolation and biochemical characterization of *Bacillus pumilus* lipases from the antarctic, **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.23, n.5, p.661-667.
- [14] Etchegaray, A. *et al.* (2017) Production of *Bacillus amyloliquefaciens* 0G and its metabolites in renewable media: valorisation for biodiesel production and p-xylene decontamination. **Can. J. Microbiol.**, v.63, n.1, p.46-60.
- [15] Yang, H., *et al.* (2015), A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.42, n.8, p.1139-1147.