

AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE NITROGÊNIO EM FERMENTAÇÃO DE *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129

JOÃO V. A. BERNARDES^{1,3*}, GISLAINE FERNANDES², ISABEL C. P. PAZ³, ALEXANDRE M. GUIMARÃES³, ANA C. CHESCA¹

¹Universidade de Uberaba, Programa de Mestrado em Engenharia Química

²Instituto Federal do Triângulo Mineiro ³Biota Innovations

*e-mail: jvabernardes@gmail.com

RESUMO- Os microrganismos vêm sendo amplamente utilizados para formulações de bioinsumos. Nesse contexto, as fermentações de *Bacillus* vem ganhando importância, e conhecer o microrganismo e meio de cultura com que se trabalha é imprescindível, para um bom rendimento do processo. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o consumo de nitrogênio de uma fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens*, em escala laboratorial ao longo de 48 horas. O nitrogênio do meio de cultura foi fornecido a partir da utilização de extrato de levedura.

INTRODUÇÃO

Bacillus amyloliquefaciens

O controle biológico e o uso de bioinsumos vem crescendo a cada ano no Brasil, em substituição aos defensivos químicos. Os microrganismos desempenham um papel fundamental nesse crescimento, principalmente espécies do gênero *Bacillus*. Entre elas podemos citar o *Bacillus amyloliquefaciens*, espécie isolada pela primeira vez em 1943. Seu nome se deve a sua capacidade de produzir a enzima α -amilase (PRIEST et al, 1987).

Morfologicamente, a bactéria é um bastonete gram-positivo, formador de endósporos e que possui ampla utilização na biotecnologia e agricultura devido a sua capacidade de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e induzir a resistência sistêmica em plantas.

Em fermentações em escala industrial é de suma importância o conhecimento profundo do microrganismo, desde os seus aspectos morfológicos, até o seu comportamento, como o tempo de cultivo, velocidades de crescimento, taxas de conversão de substrato e

produto, como também sua resposta aos diferentes meios de cultivo.

O nitrogênio é um nutriente essencial para as bactérias, participando da síntese de proteínas, nucleotídeos e metabólitos secundários (GOBERT et al., 2019). O metabolismo do nitrogênio tende a ser um processo complexo de transformação biológica de nitrogênio inorgânico externo, como amônio, nitrito, nitrato ou ureia em nitrogênio orgânico, envolvendo uma complexa regulação (HE et al, 2023).

Industrialmente, o extrato de levedura é amplamente utilizado como uma fonte barata de nitrogênio, uma vez que possui em sua composição vários aminoácidos, vitaminas, minerais e outros fatores de crescimento para os microrganismos (ALAM et al 1989).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas fermentações de *B. amyloliquefaciens* cepa BIB 0129 em escala laboratorial no laboratório da Biota Innovations na cidade de Uberaba, MG. Foi utilizado o meio de cultura próprio da empresa,

com concentração de 8,4g/ de extrato de levedura. A composição completa do meio não será divulgada por questões de sigilo industrial.

A partir de uma suspensão de *B. amyloliquefaciens*, foi feita a inoculação de um Erlenmeyer de 5L contendo 1,8L de meio de cultura, o momento da inoculação consistiu em o tempo zero da fermentação. As fermentações foram conduzidas por 48 horas.

No tempo zero, e a partir dele a cada 4 horas foram pipetados 5 mL da fermentação para quantificação do nitrogênio total do meio. A amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi analisado pelo método Kjeldahl.

O método Kjeldahl desenvolve-se em três etapas distintas: digestão da amostra por ação de ácido sulfúrico concentrado, utilizando catalisador para acelerar esta etapa; destilação do nitrogênio e titulação ácida (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984).

Foi utilizado o destilador de nitrogênio da Tecnal TE-0363[®] (figura 1), localizado no laboratório de Bromatologia do IFTM Campus Uberaba.



Figura 1: Destilador de nitrogênio Tecnal TE-0363[®]

Ao todo foram processadas 82 amostras oriundas de 41 pontos das quatro repetições. Todas as análises foram realizadas em duplicatas. Na figura 2 estão expressos os Erlenmeyers contendo a solução de borato de amônio resultante do processo de destilação.



Figura 2: Erlenmeyers após etapa de destilação

RESULTADOS

A partir dos resultados das análises foi feita uma tabela da porcentagem de nitrogênio da amostra em função do tempo, conforme a tabela 1.

Tabela 1: % de Nitrogênio da amostra em função do tempo

Tempo (h)	% de N	g/L de Nitrogênio
0	0,1115	1,1150
4	0,1048	1,0480
8	0,1012	1,0124
14	0,0933	0,9331
18	0,0922	0,9220
22	0,0929	0,9293
28	0,0925	0,9251
38	0,0895	0,8952
42	0,0884	0,8839
44	0,0896	0,8964
46	0,0903	0,9026

Fonte: Dados experimento.

Os valores expressos na tabela 1 mostram a porcentagem de nitrogênio em 1 mL de amostra analisada.

Valores baixos de teor de nitrogênio foram encontrados ao longo da fermentação. Para efeito de comparação também foi analisado o meio de cultura estéril que apresentou uma concentração de 1,2780g/L de nitrogênio no meio de cultura, valor um pouco acima do encontrado no sobrenadante do tempo zero. Conforme o gráfico presente na figura 3, podemos observar uma queda na

concentração de nitrogênio ao longo da fermentação.

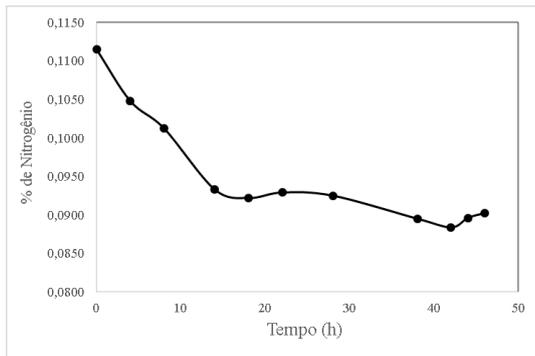


Figura 3: % de nitrogênio da fermentação em função do tempo

Entre os tempos 0 e 14 da fermentação pode ser observada uma queda mais acentuada do nível de nitrogênio do meio, caracterizando a fase log de crescimento de *B. amyloliquefaciens*, fase em que há maior consumo de extrato de levedura, o principal substrato nitrogenado do meio de cultura.

Tabela 2: % de Nitrogênio entre os tempos 0 e 14 horas.

Tempo (h)	% de N
0	0,1115
4	0,1048
8	0,1012
14	0,0933

Fonte: Dados experimento.

Ao se traçar um gráfico com o consumo de nitrogênio no intervalo de tempo da fase log, com uma linha de tendência podemos observar uma linha quase reta de consumo de substrato.

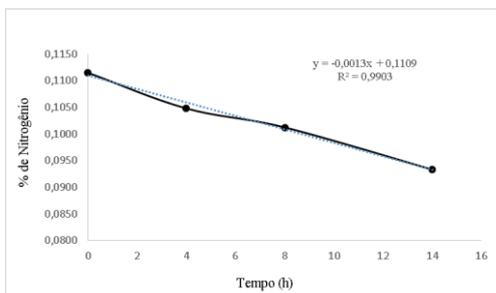


Figura 4: Consumo de nitrogênio na fase log

Em fermentações de microrganismos, o substrato pode ser consumido com a finalidade de obtenção de algum produto específico como por exemplo em indústrias de produção de etanol ou simplesmente, o substrato será utilizado para a manutenção da biomassa celular.

De acordo com Hiss (2001), em fermentações industriais dificilmente são observados valores constantes de conversão de substrato em produto, pois isso depende da relação do microrganismo com o substrato, demais componentes do meio e também da parcela de energia do microrganismo destinada para manutenção das suas funções vitais.

Alves et al (2020) em fermentações utilizando *Bacillus megaterium* para produção do polímero poli(3-hidroxi-butarato), observaram um baixo consumo de nitrogênio em suas fermentações, variando o consumo entre 0,09g/L e 0,13g/L.

A partir da curva de consumo de nitrogênio do meio de cultura, observa-se que o consumo de nitrogênio foi baixo ao longo das 48 horas de fermentação, variando de 1,1150g/L no tempo zero a 0,9026g/L de N no tempo 46.

CONCLUSÃO

Conhecer o comportamento do microrganismo é de suma importância para o correto dimensionamento de fermentações e ampliações de escala. E para isso um passo importante é o ajuste do meio de cultura. Pelos resultados das análises podemos concluir que houve um baixo consumo de nitrogênio pelo microrganismo. Serão realizados trabalhos futuros em que serão avaliadas novas concentrações do substrato nitrogenado (extrato de levedura) para verificar o comportamento da fermentação e eventuais ajustes no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

ALAM, S.; HONG, J.; WEIGAND, W. A. Effect of Yeast Extract on α -Amylase Synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 33, Pp. 780-785, 1989.

ALVES, M. I., MACAGNAN, K. L., PIECHA, C. R., TORRES, M. M., RODRIGUES, R.S.; DIAZ, P. S., MOREIRA, A. S. Efeito do pH e sacarose no acúmulo de P (3HB) por *Bacillus megaterium* CN3 utilizando DCCR 22. **Brazilian Journal of Development**, (2020) 6(4), 19116-19122.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists**. 14. ed. Washington, 1984.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SPARROW, C. MORGE, C.; ALEXANDRE, H. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Food Microbiology** 2019; 83:71–85

HE, H.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. Understanding and application of *Bacillus* nitrogen regulation: A synthetic biology perspective. **Journal of Advanced Research** 49. (2023); 1-14.

Hiss, H. Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.R, editores. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher; 2001. p. 93-122

PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L.A.; BERKELEY, R.C.W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**. 1987, 37, 69–71