



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**INFLUÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis*  
ATCC 21332**

**TAISE BONFIM MARTINS  
Engenheira Química**

Florianópolis – SC  
2016.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**TAISE BONFIM MARTINS**

**INFLUÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NA  
PRODUÇÃO DE BIOCENSOBACTANTE POR *Bacillus subtilis*  
ATCC 21332**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Coorientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis – SC  
2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Martins, Taise Bonfim

Influência da Transferência de Oxigênio na Produção de Biossurfactante por  
*Bacillus subtilis* ATCC 21332 / Taise Bonfim Martins ; orientador, Hugo Moreira  
Soares ; coorientador, Willibaldo Schmidell Netto

137 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Surfactina. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Transferência  
de oxigênio. I. Moreira Soares, Hugo. II. Schmidell Netto, Willibaldo. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. IV. Título.

**Influência da Transferência de Oxigênio na Produção de  
Biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332**

por

**Taise Bonfim Martins**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares  
orientador

---

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto  
coorientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares  
coordenadora

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glauca Maria Falcão de Aragão

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me guiar ao longo desta caminhada.

Ao meu orientador Professor Dr. Hugo Moreira Soares pela orientação e suporte ao longo do trabalho.

Ao meu coorientador Professor Dr. Willibaldo Schmidell Neto pela paciência, apoio, pelos conhecimentos compartilhados, e por toda a dedicação ao meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), especialmente a Janaína, com a qual pude aprender grande parte da metodologia, e a Karen, que me acompanhou durante a parte experimental. Agradeço a todos pela amizade, pelo companheirismo, por todos os momentos compartilhados e por terem sido como uma família durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Santa Catarina.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições na melhoria deste trabalho.

Às amigas Yenny, Francielle, Flora, Leia e Naiana por todo apoio, amizade, carinho e momentos compartilhados durante esse período. Levo comigo as melhores lembranças desse tempo que passamos juntas.

Aos amigos Blender, Thalita, Taysa, Bruna, Sthéfanie e Eloise por todo apoio, apesar da distância. Obrigada por serem os melhores amigos que a vida poderia me dar.

Ao meu namorado Fernando pela compreensão, carinho, amor e por toda atenção dedicada ao meu trabalho.

E em especial a minha família, que foi durante todos esses anos minha força e meu maior incentivo. Agradeço aos meus pais por acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.



## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos anfífilos produzidos por microrganismos e que são capazes de diminuir as tensões superficiais e interfaciais. A surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, apresenta-se como um dos biossurfactantes mais poderosos em termos de atividade superficial. Contudo, o alto custo e o baixo rendimento associados à sua produção acaba limitando sua aplicação extensiva na indústria. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que visem aumentar o rendimento e diminuir os custos envolvidos na produção desse biossurfactante. O fornecimento de oxigênio dissolvido suficiente, através da agitação mecânica e da aeração, é essencial para garantir a eficiência do processo de produção da surfactina. Entretanto, quando se conduz um processo em biorreator em aerobiose, é necessário avaliar a capacidade de transferência de oxigênio do sistema através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ). Diante do que foi exposto, este estudo propõe a caracterização da agitação e aeração do biorreator a ser empregado, através da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) em condições de baixas vazões de aeração, além da execução de ensaios para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em determinados valores de  $k_{La}$ . Os ensaios foram conduzidos em biorreator descontínuo, em meio salino composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e suplementado com extrato de levedura. Os resultados mostraram que as maiores produtividades em surfactina foram obtidas quando houve uma transferência de oxigênio mais eficiente, ou seja, quando se utilizaram os maiores valores de  $k_{La}$ . Para os ensaios realizados com aeração em profundidade, a concentração de surfactina foi muito maior no líquido efluente do que dentro do biorreator, e, assim, a maior parte do biossurfactante produzido foi recuperada através da espuma. Além disso, na maioria dos ensaios houve uma redução da concentração celular na espuma, bem como da concentração de substrato, em relação ao que foi encontrado no reator, o que pode ser de grande importância, dependendo de como se pretende operar o biorreator.

**PALAVRAS-CHAVE:** surfactina, biossurfactante, *Bacillus subtilis*, transferência de oxigênio.



## ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic compounds that are able to lower the surface and interfacial tension. Surfactin appears as one of the most powerful biosurfactants due its high superficial activity. However, the high cost and low yield associated with surfactin production end up limiting its widespread implementation in industry. Thus, it is necessary to develop strategies that allow higher yields and lower costs in the production of this biosurfactant. The supply of sufficient dissolved oxygen through mechanical agitation and aeration appears to play important roles in the efficiency of surfactin production. Nevertheless, when we operates a reactor under aerobic conditions, it is necessary to evaluate the oxygen transfer capacity of the system through the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ). Based on the above considerations, the aim of this study is to characterize the aeration and agitation of the bioreactor, which will be used, by determining the volumetric oxygen transfer coefficient under low rates of aeration and agitation, as well as carrying on experiments for surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 according to the certain  $k_La$  values. The fermentations were carried on in a stirred tank batch bioreactor in a mineral salts medium composed by 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose and supplemented with yeast extract. The results showed that the highest surfactin productivities were achieved when there was an efficient oxygen transfer, in other words, when larger  $k_La$  values were employed. For the experiments conducted under a series of combination of aeration and agitation rates, surfactin concentration was higher in the effluent liquid than into the bioreactor, and thus, most of the biosurfactant was recovered in the foam. In addition, in most of the fermentations there was a biomass concentration decrease in the foam, as well as a substrate concentration decrease, which may be valuable information for process design.

**KEY-WORDS:** surfactin, biosurfactant, *Bacillus subtilis*, oxygen transfer.



## NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

NB	<i>Nutrient Broth</i>
OD	Oxigênio dissolvido ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ )
CMC	Concentração Micelar Crítica
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
MEOR	Recuperação Avançada de Petróleo por Microrganismos
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{h}^{-1}$ )
$k_p$	Constante de atraso do eletrodo ( $\text{h}^{-1}$ )
$C_S$	Concentração de oxigênio na saturação ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ )
$C_p$	Sinal do eletrodo ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ )
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
$\mu$	Velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_S$	Velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{g}_{\text{glicose}}\cdot\text{g}_{\text{células}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$\mu_P$	Velocidade específica de produção ( $\text{mg}_{\text{surfactina}}\cdot\text{g}_{\text{células}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$P_r$	Produtividade em surfactina ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$P_x$	Produtividade em células ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células ( $\text{g}_{\text{células}}\cdot\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto ( $\text{mg}_{\text{surfactina}}\cdot\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ )
$X_m$	Massa de células (g)
X	Concentração celular ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$P_m$	Massa de surfactina (mg)
P	Concentração de surfactina ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$S_m$	Massa de substrato (g)
S	Concentração de substrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Formação de agregado micelar. ....	30
Figura 2.2 Estrutura do principal isômero da surfactina. ....	33
Figura 3.1 Curva padrão da tensão superficial em relação à concentração de Surfactina da marca Sigma <sup>®</sup> , com grau de pureza de 98 %.....	47
Figura 4.1 Resposta do eletrodo ( $C_p$ ) em função do tempo (t) para a determinação da constante de atraso do eletrodo ( $k_p$ ). ....	53
Figura 4.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) nas condições de 0,2 vvm de aeração e 100 rpm de agitação. ....	54
Figura 4.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio para diferentes frequências de agitação e vazões de aeração. ....	56
Figura 4.4 Concentração celular de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em função do tempo em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C. ....	57
Figura 4.5 Evolução do crescimento celular, do consumo de glicose e da produção de surfactina durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator anaeróbico. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Office Excel</i> 2013. ....	60
Figura 4.6 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido em anaerobiose. ....	61
Figura 4.7 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob anaerobiose. ....	62
Figura 4.8 Relação entre o crescimento celular e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	63
Figura 4.9 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido em anaerobiose. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos no <i>software Microsoft Excel</i> 2013. ....	64
Figura 4.10 Relação entre a massa de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em anaerobiose. ....	65
Figura 4.11 Evolução do crescimento celular, do consumo de glicose, concentração de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido	

durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, em biorreator conduzido sob aeração superficial. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel</i> 2013. ....	68
Figura 4.12 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido sob aeração superficial. ....	69
Figura 4.13 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob aeração superficial. ....	70
Figura 4.14 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	71
Figura 4.15 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob aeração superficial. ....	72
Figura 4.16 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em aeração superficial. ....	73
Figura 4.17 Evolução do crescimento celular, do consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel</i> 2013. ....	78
Figura 4.18 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	80
Figura 4.19 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	81
Figura 4.20 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	82
Figura 4.21 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	83

Figura 4.22 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	84
Figura 4.23 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 200 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	88
Figura 4.24 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 200 rpm. ....	89
Figura 4.25 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 200 rpm. ....	90
Figura 4.26 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	91
Figura 4.27 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 200 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	92
Figura 4.28 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm. ....	93
Figura 4.29 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	97
Figura 4.30 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 400 rpm. ....	98
Figura 4.31 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 400 rpm. ....	99

Figura 4.32 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	100
Figura 4.33 Evolução da produção de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	101
Figura 4.34 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em aeração superficial. ....	102
Figura 4.35 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	106
Figura 4.36 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm. ....	108
Figura 4.37 Evolução da produtividade em células ao longo do cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm. ....	109
Figura 4.38 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	110
Figura 4.39 Evolução da produção de surfactina e da produtividade durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 250 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	111
Figura 4.40 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	112
Figura 4.41 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel 2013</i> . ....	116

Figura 4.42 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 400 rpm. ....	117
Figura 4.43 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 400 rpm. ....	118
Figura 4.44 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	119
Figura 4.45 Evolução da produção de surfactina e da produtividade durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo <i>software Microsoft Excel</i> 2013. ....	120
Figura 4.46 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	121



## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Valores de $k_L a$ obtidos para diferentes condições de agitação e aeração em um reator de 7 L com volume útil de 5L. ....	55
Tabela 4.2 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo em anaerobiose em um volume de reação de 5L. ....	58
Tabela 4.3 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em anaerobiose em um volume de reação de 5 L. ....	59
Tabela 4.4 Dados da produção de surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em anaerobiose em um volume de reação de 5 L. ....	60
Tabela 4.5 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo em aeração superficial em um volume de reação de 5 L. ....	66
Tabela 4.6 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em aeração superficial em um volume de reação de 5 L. ....	67
Tabela 4.7 Dados da produção de surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em aeração superficial em um volume de reação de 5 L. ....	67
Tabela 4.8 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	75
Tabela 4.9 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	76
Tabela 4.10 Dados da produção de surfactina (P) em concentração e em massa para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm. ....	77
Tabela 4.11 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm. ....	85
Tabela 4.12 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm. ....	86
Tabela 4.13 Dados da surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm. ....	87

Tabela 4.14 Dados da biomassa ( $X$ ) em concentração e em massa para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm. ....	94
Tabela 4.15 Dados da glicose ( $S$ ) em concentração e em massa para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm. ....	95
Tabela 4.16 Dados da produção de surfactina em concentração e em massa para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm. ....	96
Tabela 4.17 Dados da biomassa em concentração ( $X$ ) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm. ....	103
Tabela 4.18 Dados da glicose em concentração ( $S$ ) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm. ..	104
Tabela 4.19 Dados da surfactina em concentração ( $P$ ) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm. ....	105
Tabela 4.20 Dados da biomassa em concentração ( $X$ ) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm. ....	113
Tabela 4.21 Dados da glicose em concentração ( $S$ ) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm. ..	114
Tabela 4.22 Dados da produção de surfactina em concentração ( $P$ ) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm. ....	115
Tabela 4.23 Máximas concentrações de surfactina e máximas produtividades encontradas durante os cultivos conduzidos em biorreator. ....	122

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>1.2 Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Surfactantes</b> .....	29
<b>2.2 Biossurfactantes</b> .....	30
<b>2.2.1 Surfactina</b> .....	32
<b>2.4 Produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Determinação da constante de atraso do eletrodo</b> .....	41
<b>3.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (<math>k_L a</math>)</b> .....	42
<b>3.3 Microrganismo</b> .....	43
<b>3.4 Obtenção da cultura estoque de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332</b> .....	43
<b>3.5 Meio de cultivo</b> .....	44
<b>3.6 Condições de cultivo</b> .....	44
<b>3.6.1 Cultivo em Agitador Orbital para a Definição do Tempo de Incubação do Inóculo</b> .....	44
<b>3.6.2 Cultivos em Biorreator</b> .....	45
<b>3.7 Determinações analíticas</b> .....	45
<b>3.7.1 Amostragem</b> .....	45
<b>3.7.2 Determinação da Concentração da Biomassa</b> .....	46
<b>3.7.3 Determinação da Concentração de Glicose</b> .....	46
<b>3.7.4 Determinação da Concentração de Surfactina</b> .....	47
<b>3.8 Tratamento dos dados</b> .....	48
<b>3.8.1 Velocidades específicas</b> .....	49
<b>3.8.2 Produtividade em Células e em Surfactina</b> .....	51
<b>3.8.3 Fatores de Conversão</b> .....	52
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>

<b>4.1 Determinação da constante de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Cultivo em agitador orbital para a definição do tempo de incubação do inóculo.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Cultivos em biorreator.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.1 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Anaeróbio .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.2 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Operado sob Aeração Superficial.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.3 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Aerado em Profundidade .....</b>	<b>73</b>
<b>4.4.3.1 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator operado em <math>k_L a</math> de <math>8,5 \text{ h}^{-1}</math> (0,2 vvm e 100 rpm) .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4.3.2 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator operado sob <math>k_L a</math> de <math>13,3 \text{ h}^{-1}</math> (0,2 vvm e 200 rpm).....</b>	<b>85</b>
<b>4.4.3.3 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator operado sob <math>k_L a</math> de <math>51,2 \text{ h}^{-1}</math> (0,2 vvm e 400 rpm).....</b>	<b>93</b>
<b>4.4.3.4 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator operado sob <math>k_L a</math> de <math>39,2 \text{ h}^{-1}</math> (0,3 vvm; 250 rpm) .....</b>	<b>102</b>
<b>4.4.3.5 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator operado sob <math>k_L a</math> de <math>70,3 \text{ h}^{-1}</math> (0,3 vvm e 400 rpm).....</b>	<b>112</b>
<b>4.5 Avaliação da influência da transferência de oxigênio na produção de surfactina.....</b>	<b>122</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>127</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>129</b>
<b>8 APÊNCICE.....</b>	<b>135</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial sendo, por isso, largamente utilizados em vários setores industriais, incluindo a indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), indústria de petróleo e a indústria de cosméticos e produtos de higiene (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Entretanto, a maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são derivados do petróleo e são parcialmente biodegradáveis, podendo ainda ser tóxicos para o ambiente. Diante disso, tem-se investigado o uso de biosurfactantes, os quais são compostos orgânicos que exibem atividade superficial e que consistem de subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (DEBON, 2015).

Os biosurfactantes, além de serem capazes de reduzir a tensão superficial, podem ser produzidos a partir de matérias primas baratas e renováveis, exibem baixa toxicidade, são biodegradáveis, e são efetivos mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade. (AMANI et al., 2010; DEBON, 2015).

Essas propriedades dos biosurfactantes são essenciais na recuperação avançada de petróleo (*Microbial-Enhanced Oil Recovery - MEOR*) (NITSCHKE; PASTORE, 2002; AMANI et al., 2010). A MEOR consiste no emprego de metabólitos produzidos por microrganismos, tais como biosurfactantes, para reduzir a tensão interfacial óleo-rocha e, assim, reduzir as forças capilares que impedem a movimentação do petróleo através dos poros das rochas (NITSCHKE; PASTORE, 2002; YOUSSEF et al., 2007).

O uso dos biosurfactantes na MEOR, pode se dar através da injeção de microrganismos juntamente com nutrientes necessários para seu crescimento e produção de biosurfactante *in situ*, ou ainda, é possível produzir biosurfactantes em reatores e introduzi-los no reservatório, sendo que esta última estratégia caracteriza a produção *ex situ* (DEBON, 2015). A produção *in situ* de biosurfactantes por bactérias do gênero *Bacillus* apresenta-se como uma das mais promissoras (YOUSSEF et al., 2007).

A surfactina, produzida pela cepa *Bacillus subtilis* ATCC 21332, é reconhecida como um dos biosurfactantes mais efetivos dentre os disponíveis, já que é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m em concentrações menores que 0,005% (DESAI; BANAI, 1997; YEH; WEI; CHANG, 2006). Contudo, o alto custo e o baixo rendimento associados à produção de surfactina acaba limitando

sua aplicação extensivamente na indústria. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que visem aumentar o rendimento e diminuir os custos envolvidos na produção desse biossurfactante (YEH; WEI; CHANG, 2006).

Sabe-se que o fornecimento de oxigênio dissolvido suficiente, através da agitação mecânica e da aeração, são essenciais para garantir a eficiência do processo de produção da surfactina (YEH; WEI; CHANG, 2006). No entanto, o emprego de uma alta vazão de aeração, a fim de promover as condições de  $O_2$  suficientes, ocasiona uma produção intensa de espuma em um curto período de tempo, resultando no transbordamento do caldo de cultivo através da linha de exaustão do reator e, conseqüentemente, na diminuição significativa do volume de cultivo. Essa diminuição do volume de cultivo acaba acarretando um baixo crescimento celular e, portanto, uma baixa produção de biossurfactante, já que se trata de uma produção associada ao crescimento (KIM et al., 1997).

Segundo Kronemberger (2007), a elevada produção de espuma está relacionada também a presença de proteínas extracelulares e das próprias células microbianas, o que resulta em grandes gastos para o controle das mesmas. Além disso, quebradores de espuma mecânicos não são muito eficientes e agentes anti-espumantes químicos podem alterar a qualidade do produto e o potencial poluente do efluente final do fermentador.

Nesse sentido, o uso de baixas vazões de aeração constitui uma estratégia interessante, visando não apenas fornecer o oxigênio dissolvido suficiente, mas também minimizar os problemas relacionados à formação intensa de espuma.

Quando se conduz um processo em biorreator em condições de aerobiose, faz-se necessário avaliar a capacidade de transferência de oxigênio do sistema de agitação e aeração. Essa capacidade é representada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), que pode ser manipulado através do aumento da velocidade de rotação do sistema de agitação e através do aumento da vazão de aeração.

Diante do que foi exposto, este estudo propõe a caracterização da agitação e aeração do biorreator a ser empregado, através da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), em condições de baixas vazões de aeração, além da execução de ensaios para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, em determinados valores de  $k_La$ .

## 1.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral o estudo cinético da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator agitado e aerado, operado em determinados valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ).

## 1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) em condições de baixas vazões de aeração em biorreator com volume útil de 5 L contendo água e sem a presença de microrganismos;
- b) Realizar um estudo cinético da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator descontínuo, em condições de baixas vazões de aeração;
- c) Realizar um cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator descontínuo em condição de anaerobiose para a produção de surfactina, a fim de efetuar a comparação com os ensaios em aerobiose;
- d) Investigar a influência da transferência de oxigênio na produtividade em surfactina.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Surfactantes

Os surfactantes ou tensoativos são moléculas anfipáticas formadas por uma região hidrofóbica (apolar) e uma região hidrofílica (polar). A porção hidrofóbica é constituída geralmente por uma cadeia hidrocarbônica extensa saturada ou insaturada. Já a porção hidrofílica é formada por grupos iônicos (aniônicos ou catiônicos), não-iônicos ou anfotéricos, os quais podem exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH (DESAI; BANAI, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002; REIS, 2007).

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas que apresentam diferentes graus de polaridade, formando um filme molecular ordenado nessas interfaces, o que reduz a tensão superficial e interfacial (LIN, 1996; DESAI; BANAI, 1997).

Em virtude dessas propriedades, os surfactantes são amplamente utilizados na indústria, incluindo a de petróleo, de cosméticos, de produtos de higiene e de limpeza, sendo este último o setor que utiliza a maior parte dos surfactantes produzidos como matéria-prima para a fabricação de detergentes de uso doméstico (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BARROS et al., 2007).

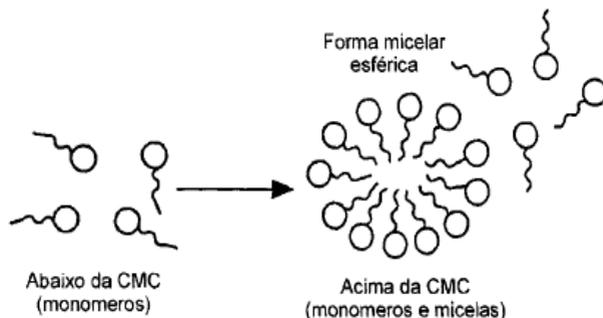
Os surfactantes apresentam a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, se formam a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC) e depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, temperatura, etc) (MANIASSO, 2001; BARROS et al., 2007).

A concentração micelar crítica (CMC) é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante, sendo também caracterizada como a concentração de surfactante necessária para atingir os menores valores de tensão superficial ou interfacial (LIN, 1996; BARROS et al., 2007). Dessa forma, surfactantes eficientes apresentam uma CMC baixa, já que suas concentrações necessárias para reduzir a tensão superficial ao máximo é menor (PERNA, 2010).

Abaixo da CMC, o tensoativo encontra-se na forma de monômeros. Entretanto, quando a concentração está abaixo, mas

próxima da CMC, as micelas e monômeros coexistem em um equilíbrio dinâmico (Figura 2.1) (MANIASSO, 2001).

Figura 2.1 Formação de agregado micelar.



Fonte: Maniasso, 2001.

Em concentrações acima da CMC, as moléculas de surfactantes se associam para formar grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, e as tensões superficial e interfacial permanecem quase que constantes (LIN, 1996; PERNA, 2010).

## 2.2 Biosurfactantes

Os biosurfactantes são compostos produzidos por microrganismos, tais como bactérias, fungos e leveduras, que apresentam propriedades surfactantes, isto é, são capazes de diminuir as tensões superficiais e interfaciais e exibem alta capacidade emulsificante (FERNANDES, 2007; PERNA, 2010; SANTOS DA SILVA et al., 2015).

Apesar dos surfactantes sintéticos serem classificados pela natureza do seu grupo polar, os biosurfactantes são categorizados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes desses compostos incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados, sendo os lipopeptídeos os biosurfactantes mais efetivos (DESAI; BANAI, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002; PERNA, 2010).

As principais propriedades dos biossurfactantes estão relacionadas às muitas vantagens que eles oferecem em relação aos surfactantes de origem química. Tais vantagens incluem baixa toxicidade, o que permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos; elevada biodegradabilidade, sendo facilmente degradáveis na água e no solo, o que torna conveniente sua aplicação na biorremediação e no tratamento de resíduos; são efetivos em uma ampla faixa de temperatura e pH e suportam meios com altas concentrações salinas (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; YEH; WEI; CHANG, 2006; PERNA, 2010).

Além disso, os biossurfactantes produzem menores tensões superficial e interfacial em menores concentrações quando comparados aos surfactantes químicos, podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, o que possibilita aplicações específicas para cada caso. (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Os biossurfactantes apresentam a capacidade de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos, o que facilita o crescimento de microrganismos nesses substratos. Entretanto, as cepas de *Bacillus subtilis* conseguem produzir biossurfactante apenas em substratos hidrossolúveis, tal como a glicose, onde a solubilização do hidrocarboneto não é necessária (COOPER et al., 1981; LIN, 1996; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Outra função fisiológica dos biossurfactantes que deve ser destacada é a atividade antibiótica que pode estar relacionada com suas propriedades anfipáticas. Rhamnolipídios de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* conseguem solubilizar os principais componentes das membranas celulares microbianas. Assim, a excreção destes biossurfactantes no meio proporciona aos microrganismos maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996; COSTA, 2008).

Os surfactantes microbianos podem ser utilizados nos mais diversos ramos industriais, destacando-se as indústrias de cosméticos, alimentícia, química, agrícola e de produtos de limpeza. Contudo os altos custos de produção, juntamente com os métodos ineficientes de recuperação dos biossurfactantes, ainda continuam sendo os maiores obstáculos para suas aplicações comerciais (YEH; WEI; CHANG, 2006; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

Apesar da maior parte dos surfactantes produzidos industrialmente serem de origem petroquímica, os biossurfactantes estão ganhando importância e necessitam competir com os surfactantes

químicos em relação ao custo, funcionalidade e capacidade de produção, a fim de atender a demanda. Quando se utilizam baixos volumes de biossurfactantes em produtos de alto valor agregado, tais como cosméticos e medicamentos, um composto de alto custo de produção é aceitável. Entretanto, em aplicações como a recuperação de petróleo, na qual altos volumes de surfactantes de baixo custo são necessários, o alto custo de produção não se justifica (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

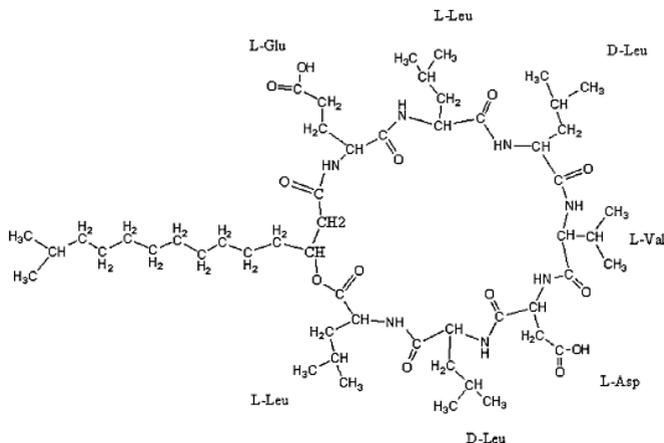
### 2.2.1 Surfactina

A surfactina, principal representante dos surfactantes lipopeptídicos, é um dos biossurfactantes mais poderosos em termos de atividade superficial, já que é capaz de reduzir a tensão superficial da água (20 °C) de 72 mN/m para 27 mN/m em concentrações inferiores a 20 mg.L<sup>-1</sup> (COOPER et al., 1981; BARROS et al., 2007; PERNA, 2010), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m (BARROS et al., 2007; PERNA, 2010).

Quando é comparada a outros biossurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, a surfactina possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC), sendo por isso considerada um biossurfactante de elevada eficiência (BARROS et al., 2007).

A surfactina pode ser sintetizada por *Bacillus subtilis* e sua estrutura geral é a de um peptídeo cíclico constituído por sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β-hidróxi (Figura 2.2), sendo que esta cadeia pode conter de 13 a 15 átomos de carbono, o que permite a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; MULLIGAN, 2005; PERNA, 2010). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3 hidróxi-13-metil-tetradecanóico, ligado por ligação lactona, tal como os demais (BARROS et al., 2007).

Figura 2.2 Estrutura do principal isômero da surfactina.



Fonte: BARROS et al., 2007.

A surfactina é um dos biossurfactantes mais estudados e tem sido amplamente caracterizada em termos de sua biossíntese e propriedades de superfície (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999). Em virtude de suas características químicas, tecnológicas e funcionais, a surfactina apresenta-se como um composto atrativo para diversas aplicações, tanto na área ambiental, como médico-farmacêutica (BARROS et al., 2007; PERNA, 2010).

As aplicações ambientais da surfactina, tais como biorremediação e biodegradação de hidrocarbonetos, estão fortemente relacionadas às suas atividades superficial e emulsificante (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Whang et al. (2008) investigaram o potencial de aplicação da surfactina na biodegradação avançada de solo e água contaminados com diesel, verificando que a adição de 40 mg/L de surfactina aumentou significativamente a biodegradação do diesel em comparação com os experimentos conduzidos sem a adição de surfactina.

Mulligan et al. (1999) avaliaram a viabilidade de aplicação da surfactina na remoção de cobre e zinco de um solo contaminado. Os resultados mostraram que 0,25% de surfactina, na presença de 0,1% de NaOH, foi capaz de remover 22 e 70% de zinco e cobre, respectivamente, o que revela a ação potencial da surfactina neste tipo de processo (MULLIGAN et al., 1999; PERNA, 2010).

A surfactina apresenta diversas funções biológicas, tais como função bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral, além de ser inibidora da formação de coágulos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BARROS et al., 2007; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Essas funções caracterizam a surfactina como molécula biologicamente ativa, estando principalmente relacionadas à sua capacidade de alterar a integridade membranal, através do estabelecimento de fortes interações com os constituintes fosfolipídicos da membrana celular (BARROS et al., 2007).

A surfactina tem propriedades anti-adesivas que inibem a formação de biofilmes de outras bactérias (BARROS et al., 2007; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Seydlova e Svobodová (2008) verificaram que a surfactina inibe a formação de biofilmes da *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*.

A atividade antiviral da surfactina foi determinada para uma larga gama de vírus, sendo que a mesma conseguiu inativar eficazmente o vírus causador de herpes, assim como o retrovírus e outros vírus de RNA e DNA compactados (BARROS et al., 2007). Além disso, a surfactina é capaz de atrasar a formação de coágulos de fibrina, pois inibe a conversão de monômero de fibrina para polímero de fibrina (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Conforme apresentado anteriormente, a surfactina aparece como um biosurfactante adequado para diversas aplicações. Entretanto, seu uso industrial acaba sendo limitado devido aos altos custos de produção e recuperação (CHEN et al., 2015). Segundo Shaligram e Singhal (2010), a recuperação, a concentração e a purificação dos biosurfactantes representam a maior parte dos custos totais de produção, fato que será abordado mais adiante nas discussões dos resultados do presente trabalho. Assim, métodos de produção mais eficientes e mais baratos precisam ser desenvolvidos (MOYA et al., 2015).

### **2.3 Transferência de oxigênio**

Para que um bioprocessamento aeróbio seja altamente eficiente, é fundamental a existência de oxigênio dissolvido no meio. Sabe-se que é sempre possível dissolver quantidades significativas das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e demais nutrientes necessários ao

crescimento dos microrganismos. No entanto, essa situação é bastante distinta para o oxigênio, que é muito pouco solúvel em água, cuja concentração na saturação é apenas da ordem de  $7 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ , (1 atm e a  $35^\circ\text{C}$ ) (SCHMIDELL, 2001).

Sendo assim, quando se deseja operar um biorreator em aerobiose, faz-se necessário a compreensão e o correto dimensionamento da transferência de oxigênio do sistema, a fim de se obter uma eficiente dissolução do oxigênio no meio líquido, para que este chegue às células e possa então ser consumido de forma plena (SCHMIDELL, 2001).

Uma forma conveniente de avaliar a transferência de oxigênio em cultivos aeróbios é a medida do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) (BADINO; ALMEIDA; CRUZ, 2004). O  $k_L a$  mede essencialmente quanto de oxigênio pode ser fornecido para as células e é um dos critérios mais utilizados no projeto e na ampliação de escala de fermentadores convencionais agitados e aerados (BADINO; ALMEIDA; CRUZ, 2004; BANDYOPADHYAY; HUMPHREY; TAGUCHI, 2009).

O valor de  $k_L a$  pode ser manipulado pela vazão de aeração e frequência de agitação (YEH; WEI; CHANG, 2006). Aumentando-se a frequência de agitação, se estaria rompendo e dispersando mais as bolhas de ar e reduzindo a espessura do filme líquido. Por outro lado, o aumento da vazão de aeração provoca um maior acúmulo de bolhas de ar no seio líquido e, dessa forma, aumenta-se a área interfacial de transferência de massa (SCHMIDELL, 2001).

A capacidade de transferência de oxigênio de dado sistema de agitação e aeração, pode ser descrita pela seguinte equação (SCHMIDELL, 2001).

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (2.1)$$

Onde:

$C$  = conc. de oxigênio dissolvido em um dato instante  $t$  ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$C_s$  = conc. de oxigênio na saturação ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{h}^{-1}$ )

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio pode ser feita através de diferentes metodologias. Um dos métodos mais utilizados é o que emprega uma sonda para a determinação da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido, sendo conhecido como método dinâmico (SCHMIDELL, 2001; BANDYOPADHYAY; HUMPHREY; TAGUCHI, 2009).

Entretanto, a sonda pode não ser capaz de fazer um perfeito acompanhamento do aumento da concentração de O<sub>2</sub> no líquido. Isso ocorre em virtude de um atraso no sinal, pois o oxigênio dissolvido no seio líquido precisa se difundir através da membrana do eletrodo, além de muitas vezes existir um filme líquido estagnado ao redor do eletrodo através do qual o oxigênio precisa se difundir (SCHMIDELL, 2001).

Com o objetivo de corrigir esse atraso, Aiba, Humphrey e Millis (1973) propuseram que o sinal da sonda (C<sub>p</sub>) varia com o tempo de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p (C - C_p) \quad (2.2)$$

Onde:

C<sub>p</sub> = sinal do eletrodo (mg.L<sup>-1</sup>)

C = concentração real de O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)

k<sub>p</sub> = constante de atraso do eletrodo (h<sup>-1</sup>)

Guez et al. (2008), através de um sistema de monitoramento da atividade respiratória, examinaram a influência da transferência de oxigênio na síntese do lipopeptídeo *mycosubtilin* por *Bacillus subtilis* ATCC6633. Os resultados obtidos revelaram que a regulação do oxigênio atuou em diferentes níveis, sugerindo que existe um sistema complexo para a regulação da produção de *mycosubtilin*.

Yeh, Wei e Chang (2006) investigaram a influência da vazão de aeração e da frequência de agitação no processo de produção de surfactina. Eles concluíram que o aumento da frequência de agitação contribui para o aumento da produção de surfactina, sendo que o melhor rendimento foi obtido nas frequências de agitação entre 200 e 300 rpm. Contudo, o uso de uma frequência de agitação maior que 300 rpm acabou reduzindo a produção de surfactina pois houve a intensa formação de espuma.

Fahim et al. (2013) utilizaram um biorreator de leite fluidizado com 3 fases para investigar a influência do  $k_{L,a}$  na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Os resultados mostraram que houve uma diminuição do  $k_{L,a}$  durante o processo fermentativo. Essa diminuição está relacionada à redução da tensão superficial devido à produção de biossurfactante.

Na verdade, os surfactantes provocam uma diminuição do tamanho médio da bolha e, conseqüentemente, aumentam a área interfacial, o que contribui positivamente para a transferência de oxigênio. No entanto, eles também podem ter um efeito negativo sobre o  $k_{L,a}$  devido à sua imobilização sobre a superfície da bolha, o que dificulta a transferência de massa (FAHIM et al., 2013).

Ghribi e Ellouza-Chaabouni (2011) também avaliaram o efeito de várias condições de aeração na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, utilizando uma concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>. Verificou-se que, quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 30% da saturação, a produção de surfactante alcançou 4,92 g.L<sup>-1</sup>. Contudo, a produção de biossurfactante diminuiu drasticamente quando se utilizou maiores vazões de aeração.

Conforme apresentado, a transferência de oxigênio está intimamente relacionada à produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Porém, altas velocidades de agitação e aeração necessárias para fornecer quantidades suficientes de oxigênio para os cultivos, promovem a formação excessiva de espuma. Essa produção intensa de espuma acaba diminuindo o rendimento do processo, já que retira do meio reacional parte da biomassa e do substrato, dificultando o controle do processo (FAHIM et al., 2013; CHEN; JUANG; WEI, 2015).

O objetivo principal das operações de transferência de massa é colocar duas fases em contato para a eficiente transferência de uma ou mais espécies entre elas. As taxas de transferência de cada componente dependem diretamente da área de contato estabelecida entre as fases e dos coeficientes de transferência de massa das espécies em cada fase. Entretanto, o fato das duas fases estarem diretamente em contato favorece a formação de espumas e emulsões (KRONEMBERGER, 2007).

Kronemberger (2007) avaliou a produção em biorreator de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando um contactor de membranas a fim de evitar a formação de espuma e viabilizar a fermentação aeróbia. O oxigênio foi transferido através de uma interface fixa e bem definida, ao invés de ser transferido

por meio da interface da bolha. Como não havia borbulhamento no sistema, a espuma não era formada.

A utilização de anti-espumantes químicos não é apropriada, uma vez que eles podem afetar a fisiologia das células e reduzir a velocidade de transferência de oxigênio, além de serem caros e dificultarem o processo de purificação do produto (KOCH et al., 1995; FAHIM et al., 2013).

## 2.4 Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* é o microrganismo mais importante na produção de surfactina. Caracteriza-se como uma bactéria gram-positiva, que apresenta forma de bastonete e que pode ser naturalmente encontrada em vários ambientes, especialmente no solo (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Além disso, é capaz de crescer em amplas faixas de temperatura e pH, sendo que as temperaturas compreendidas entre 30 e 40°C e o pH na faixa de 5,5 a 8,5 aparecem como condições mais adequadas para o seu cultivo (VALPUESTA, 2008).

Esta espécie bacteriana é aeróbica facultativa, entretanto, na presença de nitratos pode crescer em condições de anaerobiose. O crescimento deste microrganismo em meios complexos contendo glicose, na presença de oxigênio, apresenta o 2,3-butanodiol, a acetoína e CO<sub>2</sub> como principais produtos do metabolismo (VALPUESTA, 2008).

O metabolismo dos microrganismos, em relação à produção de surfactantes e ao tipo de biossurfactante produzido, está intrinsicamente ligado à fonte de carbono (COSTA, 2008). Fontes de carbono, tais como glicose e sacarose, tem sido utilizadas na produção de biossurfactantes (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Pereira et al. (2013) avaliaram a produção aeróbia de biossurfactante em diferentes fontes de carbono e nitrogênio por *Bacillus subtilis*. Dentre as fontes de carbono testadas, a sacarose foi a que apresentou o menor valor da tensão superficial, variando entre 27,8-28,4 mN.m<sup>-1</sup>.

Oliveira et al. (2013) cultivaram *Bacillus subtilis* LAMI005 em condição aeróbia para a produção de biossurfactante, utilizando um meio de cultivo preparado a partir de suco de caju clarificado. Os resultados mostraram que a produção de surfactina foi influenciada pela quantidade de suco de caju utilizada para preparar o meio de cultura e alcançou uma concentração máxima de 319,3 mg/L em 72 horas de incubação.

Davis, Lynch e Varley (1999) investigaram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em aerobiose em condições de limitação tanto de oxigênio, como das fontes de carbono e nitrogênio. A condição mais favorável foi aquela em que o nitrato foi utilizado como nutriente limitante e o oxigênio foi esgotado no final da fase exponencial. A concentração máxima de surfactina alcançada nessa condição foi de  $439 \text{ mg.L}^{-1}$  após 48 horas cultivo.

Diversos aparatos experimentais têm sido propostos, a fim de contornar os problemas associados a formação excessiva de espuma e, assim, viabilizar a produção de surfactina. Yeh, Wei e Chang (2006) desenvolveram um biorreator inovador, integrando um fermentador convencional com um coletor de espuma, um reciclador de células e uma unidade de precipitação da surfactina, o que proporcionou uma concentração máxima de surfactina de  $6,45 \text{ g.L}^{-1}$ , a qual foi obtida através da espuma que transbordou do reator.

Davis, Lynch e Varley (2001) empregaram o método de fracionamento da espuma para a recuperação e concentração da surfactina. O aparato experimental consistia de um biorreator integrado a uma coluna de fracionamento da espuma, e se mostrou efetivo em termos do enriquecimento e recuperação do produto. Cooper et al. (1981) também produziram grandes quantidades de surfactina quando a mesma foi continuamente removida através do fracionamento da espuma.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os cultivos foram realizados em condições de assepsia, sendo que todos os materiais e meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min.

#### 3.1 Determinação da constante de atraso do eletrodo

A determinação da constante de atraso da sonda de oxigênio ( $k_p$ ) foi realizada através de um ensaio degrau. Inicialmente, submeteu-se o eletrodo de  $O_2$  (Mettler Toledo), previamente polarizado e calibrado, a uma atmosfera inerte contendo apenas argônio até que o valor registrado pela sonda indicasse uma concentração de oxigênio de 0%.

Em seguida, o eletrodo foi subitamente colocado em uma atmosfera saturada com ar atmosférico ( $C = C_s$ ), e registrou-se o aumento da concentração de oxigênio até a saturação, com um intervalo de amostragem de 5 segundos.

A constante de atraso pode então ser determinada a partir da Equação 2.2, considerando agora que  $C = C_s$  (saturação), a qual pode ser rearranjada da seguinte forma:

$$\frac{dC_p}{(C_s - C_p)} = k_p \cdot dt \quad (3.1)$$

Onde:

$C_s$  = Concentração real de oxigênio na saturação ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$C_p$  = sinal do eletrodo ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$k_p$  = Constante de atraso do eletrodo ( $\text{h}^{-1}$ )

Integrando a Equação 3.1 resulta:

$$\frac{C_p}{C_s} = 1 - e^{-k_p t} \quad (3.2)$$

Assim, plotou-se os valores de  $\frac{C_p}{C_s}$  em função do tempo (t),

obtidos no ensaio degrau, e por meio de um ajuste no *software Statistica 8.0* foi possível determinar o valor de  $k_p$ .

### 3.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ )

As determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) foram realizadas em água destilada, na ausência de microrganismos, em um biorreator de 7 L (MF114, New Brunswick Scientific Co) com volume útil de 5L, e o método empregado foi o método dinâmico.

Inicialmente, borbulhou-se argônio no líquido contido no reator para eliminar todo o  $O_2$  dissolvido até a sonda de oxigênio (Mettler Toledo), previamente polarizada e calibrada, indicar o valor 0%. A seguir, ajustou-se a agitação e a aeração do meio, nas condições em que se desejava determinar o  $k_L a$ , registrando-se o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio até atingir a saturação, ou seja, até que o sinal registrado fosse 100%.

Os dados foram armazenados em um *software* de aquisição de dados do biorreator em um intervalo de amostragem de 30 segundos. Entretanto, quando se utilizou frequências de agitação de 250 e 400 rpm foi necessário registrar os dados manualmente com um intervalo de amostragem de 5 segundos, pois nesses casos a concentração de oxigênio dissolvido aumentava rapidamente nos primeiros instantes. O coeficiente de transferência de oxigênio foi determinado a partir da seguinte equação:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C)$$

(3.3)

Onde:

$C$  = Concentração de oxigênio no meio líquido ( $mgO_2.L^{-1}$ )

$C_s$  = Concentração de oxigênio na saturação ( $mgO_2.L^{-1}$ )

$k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )

A qual integrada fornece:

$$\frac{C}{C_s} = 1 - e^{-k_L a t} \quad (3.4)$$

Para levar em consideração o atraso no sinal da sonda, conforme Schmidell (2001), introduz-se na Equação 2.2 o valor de C obtido na equação 3.4, sendo que a partir da integração da equação resultante, obtém-se:

$$\frac{C_p}{C_s} = 1 + \frac{k_L a}{k_p - k_L a} * e^{-k_p t} - \frac{k_p}{k_p - k_L a} * e^{-k_L a t} \quad (3.5)$$

Assim, utilizando o *software Statistica 8.0*, ajustou-se a Equação 3.5 aos dados experimentais ( $C_p = f(t)$ ), e então foi possível determinar os valores de  $k_L a$  para cada condição de agitação e aeração empregada.

### 3.3 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* ATCC 21332, pois a literatura relata que essa cepa é uma boa produtora de surfactina (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; CHEN; JUANG; WEI, 2015).

### 3.4 Obtenção da cultura estoque de *Bacillus subtilis* ATCC 21332

*Bacillus subtilis* ATCC 21332 foi obtido da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA). A cultura liofilizada foi então ressuspensa em um frasco *Erlenmeyer* de 20 mL contendo 6 mL de meio NB (*Nutrient Broth*), composto por peptona ( $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) e extrato de carne ( $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). A seguir, o frasco contendo a cultura foi incubado em agitador orbital (Quimis, Q816M20) a  $30^\circ\text{C}$  sob agitação de 150 rpm, durante 24 h. Na sequência, 0,5 mL desse meio cultivado foi transferido para tubos criogênicos de 2 mL, contendo 0,5 mL de glicerol. Os tubos contendo a cultura de *B. subtilis* ATCC 21332 foram congelados a  $-80^\circ\text{C}$ .

A cultura estoque foi obtida a partir de um dos tubos criogênicos preparados na etapa anterior, o qual continha 1 mL da suspensão celular

em glicerol. Descongelou-se então o conteúdo do tubo criogênico e o volume foi transferido para 1 frasco *Erlenmeyer* aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio NB. Este frasco foi incubado em agitador orbital a 30 °C sob agitação de 150 rpm, durante 24 h. Após esse período de incubação, o meio cultivado foi transferido, também de forma asséptica, para tubos criogênicos contendo glicerol, conforme descrito anteriormente. A suspensão celular em glicerol obtida foi denominada cultura estoque e os tubos foram armazenados a -80 °C.

### 3.5 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado no presente trabalho foi baseado no meio proposto por Cooper et al. (1981) suplementado com extrato de levedura. O meio de cultivo utilizado por Cooper et al. (1981) aparece na literatura como um dos mais utilizados para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (COOPER et al., 1981; DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999, 2001; YEH; WEI; CHANG, 2006).

O meio de cultivo apresentou a seguinte composição final (em g.L<sup>-1</sup>): glicose 10,0; NaNO<sub>3</sub> 4,25; NH<sub>4</sub>Cl 2,67; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1968; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,001; FeSO<sub>4</sub> 6,08.10<sup>-4</sup>; EDTA 0,0012; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,08; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,68; extrato de levedura 1,0.

### 3.6 Condições de cultivo

#### 3.6.1 Cultivo em Agitador Orbital para a Definição do Tempo de Incubação do Inóculo

Para a definição do tempo de incubação do inóculo realizou-se um cultivo, a fim de avaliar o crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 em agitador orbital.

O pré-inóculo foi preparado utilizando-se 2 frascos *Erlenmeyer* aletados de 500 mL contendo 150 mL de meio NB (item 3.4), sendo que para cada um foi transferido, de forma asséptica, 1 mL da cultura estoque (armazenada a -80 °C). A seguir, estes frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C sob agitação de 150 rpm, durante 24 h, em condição de aerobiose. Após 24 h, uma alíquota de cada *Erlenmeyer* foi retirada para a leitura da densidade óptica, através da absorbância, a 600 nm.

Para o preparo do inóculo, foram utilizados dois frascos *Erlenmeyer* aletados de 1000 mL contendo 450 mL de meio de cultivo (descrito no item 3.5). Para cada um desses frascos, foi transferido 50 mL do pré-inóculo que apresentou maior absorvância. Os frascos foram então incubados em agitador orbital em 150 rpm, à temperatura de 30 °C, por 41 h, em condição de aerobiose. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado em 7,0 através da adição de NaOH (3 M).

### **3.6.2 Cultivos em Biorreator**

Os ensaios em biorreator foram conduzidos em batelada, sendo que um deles foi realizado em anaerobiose e o restante em condições de aerobiose. Os cultivos foram realizados em biorreator de 7 L (MF114, New Brunswick Scientific Co), com volume útil de 5 L. O biorreator contendo 4,5 L do meio de cultura, descrito no item 3.5, foi autoclavado, mas as soluções de glicose, de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  foram autoclavadas separadamente, a fim de evitar a precipitação desses componentes no meio de cultivo, e, posteriormente, foram adicionadas a fim de completarem a constituição do meio descrito no item 3.5. O inóculo (descrito no item 3.6.1) foi adicionado na proporção de 10 % do volume final de meio no biorreator.

Os cultivos foram realizados a 32 °C e o pH mantido em 7,0 através da adição de soluções de NaOH (3 M) ou HCl (1 M). Para o ensaio em anaerobiose utilizou-se uma frequência de agitação de 300 rpm e injetou-se gás argônio estéril em tempos pré-determinados, a fim de manter o biorreator em anaerobiose. Já para os experimentos conduzidos em aerobiose foram utilizadas as condições de agitação e aeração nas quais determinaram-se os valores de  $k_L a$ .

## **3.7 Determinações analíticas**

### **3.7.1 Amostragem**

No ensaio realizado em agitador orbital foram retiradas, de maneira asséptica, amostras de 6 mL dos frascos *Ernlennmeyer* em intervalos de tempo variando de 3 a 4 horas.

Foram conduzidos 7 ensaios em biorreator, dos quais um foi em anaerobiose, outro foi com aeração superficial, ambos com intervalo de

amostragem de 3 horas. Os demais ensaios foram realizados com aeração em profundidade e as amostras foram retiradas a cada 1,5 h.

Em todos os ensaios, amostras de 15 mL foram retiradas ao longo do cultivo, das quais 3 alíquotas de 2 mL foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 14000 rpm (cerca de 11000 g) para a determinação da concentração celular, sendo o restante do volume centrifugado a 11000 rpm e congelado para posterior análise.

Além disso, nos ensaios conduzidos com aeração em profundidade, foram coletadas amostras da espuma formada durante o processo e que foi continuamente removida através da linha de exaustão do reator. Nesse caso o intervalo de amostragem também foi de 1,5 h, e as amostras de espuma foram liquefeitas naturalmente, sendo analisadas quanto à concentração celular, concentração de glicose e concentração de biossurfactante, assim como as amostras retiradas do biorreator.

### **3.7.2 Determinação da Concentração da Biomassa**

A concentração celular foi determinada por gravimetria, utilizando um volume de meio de cultura de 2 mL, o qual foi transferido para microtubos de plástico previamente pesados. Esses tubos foram centrifugados por 3 min a 14000 rpm e, a seguir, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de água destilada, centrifugado novamente, e o resíduo sólido obtido foi seco a 90 °C (em estufa) por 24 h. Após esse período, os microtubos contendo a biomassa seca, foram então pesados para a determinação da concentração celular. A determinação foi realizada em triplicata.

O restante da amostra de 15 mL retirada do biorreator, juntamente com o sobrenadante, foi centrifugado por 15 min a 11000 rpm e posteriormente congelado para análises futuras.

### **3.7.3 Determinação da Concentração de Glicose**

A concentração de glicose foi determinada através de um kit enzimático Glicose PAP Liquiform® (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). O kit enzimático era composto pelo Reagente 1 (contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase) e por um Padrão com 1000 mg.L<sup>-1</sup> de glicose. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em 505 nm.

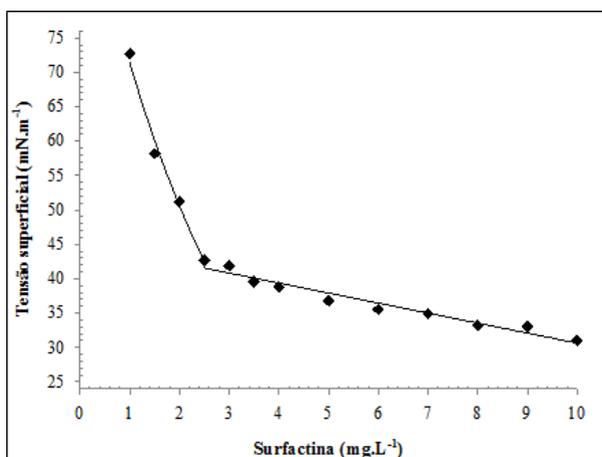
### 3.7.4 Determinação da Concentração de Surfactina

A determinação da concentração de surfactina presente nas amostras foi efetuada de maneira indireta através de uma curva padrão.

A surfactina utilizada para a construção da curva padrão foi adquirida da Sigma-Aldrich, apresentava 98 % de pureza e foi produzida a partir de *Bacillus subtilis*. A curva padrão foi elaborada através da diluição de 10 mg de surfactina em 1000 mL de água Milli-Q® (Millipore, USA), formando assim uma solução de 10 mg.L<sup>-1</sup>. A partir dessa solução foram obtidas, através de sucessivas diluições, soluções com concentração que variavam de 1 a 10 mg.L<sup>-1</sup> de surfactina. A seguir, foram realizadas as leituras da tensão superficial dessas soluções em um tensiômetro digital (KSV, Sigma 702, Finlândia) através do método da placa Wilhelmy, em temperatura ambiente. Assim, foi possível obter a curva padrão que relaciona a tensão superficial de surfactina, dada em mN.m<sup>-1</sup>, com a sua concentração expressa em mg.L<sup>-1</sup>.

Na Figura 3.1, está apresentada a curva padrão construída para a determinação da concentração de surfactina através de medidas da tensão superficial.

Figura 3.1 Curva padrão da tensão superficial em relação à concentração de Surfactina da marca Sigma®, com grau de pureza de 98 %.



Entre as concentrações de 1 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, foi ajustado uma função exponencial aos dados da curva padrão de surfactina. A partir de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, ajustou-se uma função linear aos dados.

Para valores de tensão superficial entre 72,73 e 42,73 mN.m<sup>-1</sup> a concentração de surfactina foi calculada pela Equação 3.6. A partir desse valor até 31,05 mN.m<sup>-1</sup> utilizou-se a Equação 3.7.

$$\gamma = 100,85e^{-0,345C}$$

$$R^2 = 0,989$$

(3.6)

$$\gamma = -1,455C + 45,2$$

$$R^2 = 0,953$$

(3.7)

Onde:

$\gamma$  = tensão superficial (mN.m<sup>-1</sup>)

C = concentração de surfactina (mg.L<sup>-1</sup>)

Mano (2008) e Perna (2010) também determinaram a concentração de surfactina de forma indireta utilizando uma curva padrão, sendo que a curva utilizada neste trabalho apresentou perfil semelhante à obtida por esses autores.

Assim, o caldo de cultivo e a espuma liquefeita, ambos isentos de células, foram submetidos à análise de tensão superficial para a determinação da concentração de surfactina. Antes de cada análise realizada, a placa de platina foi lavada com água destilada, etanol, sendo em seguida flambada, sendo que foram realizadas três medidas para cada amostra.

### 3.8 Tratamento dos dados

A partir do *software Microsoft Office Excel* 2013 foram realizados ajustes polinomiais, utilizando os dados experimentais de crescimento celular, consumo de substrato e de produção de surfactina.

E através desses ajustes foi possível efetuar a análise cinética dos experimentos.

Para o ajuste das Equações 3.2 e 3.5 aos dados experimentais de concentração de oxigênio dissolvido *versus* tempo, obtidos para as determinações da constante de atraso ( $k_p$ ) e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), foi utilizado o *software Statistica 8.0*.

### 3.8.1 Velocidades específicas

Para os cultivos em biorreator e em aerobiose, houve intensa produção de espuma e, conseqüentemente, a saída dessa espuma do biorreator, o que provocou alterações no volume de reação. Isto ocorreu de forma mais intensa em decorrência de maiores vazões de aeração. Por esta razão, para estes casos, os cálculos das velocidades específicas foram realizados determinando as massas de X, S e P, ou seja, levando em consideração a redução de volume no biorreator. O volume de líquido efluente foi estimado pela redução do volume no reator, sendo este valor também utilizado para o cálculo das massas de X, S e P que saíram do biorreator com a espuma.

Entretanto, durante os cultivos realizados em anaerobiose e em aeração superficial não houve formação de espuma e, conseqüentemente, não houve variação de volume. Apesar disso, os cálculos para esses ensaios também foram efetuados determinando as massas de X, S e P, a fim de padronizar a apresentação dos resultados e facilitar a comparação dos mesmos.

A partir das curvas de ajuste do crescimento celular em função do tempo, foi possível determinar as velocidades instantâneas de crescimento do microrganismo ( $dX/dt$ ). As velocidades específicas de crescimento foram obtidas a partir da divisão das velocidades instantâneas pela massa celular nesses instantes (SCHMIDELL, 2001), de acordo com a equação:

$$\mu_x = \frac{1}{X_m} \cdot \left( \frac{dX_m}{dt} \right) \quad (3.8)$$

Onde:

$X_m$  = massa celular (g)

t = tempo (h)

$\mu_x$  = velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

A velocidade específica de consumo de substrato foi determinada a partir das curvas de ajuste da massa de glicose em função do tempo. Primeiramente, determinaram-se as velocidades instantâneas de consumo de substrato e, dividindo esses valores pela massa de células no instante considerado, foi possível obter as velocidades específicas de consumo de substrato, conforme apresentado na Equação 3.9 (SCHMIDELL, 2001).

$$\mu_s = \frac{1}{X_m} \cdot \left( \frac{-dS_m}{dt} \right) \quad (3.9)$$

Onde:

$S_m$  = massa de substrato (g)

t = tempo (h)

$X_m$  = massa celular (g)

$\mu_s$  = velocidade específica de consumo de substrato  
( $g_{\text{glicose}} \cdot g_{\text{células}}^{-1} \cdot h^{-1}$ )

Através das curvas de ajuste da massa de surfactina em função do tempo, foi possível obter as velocidades instantâneas de produção. Dividindo essas velocidades instantâneas de produção pela massa de células no instante considerado, determinaram-se as velocidades específicas de produção da surfactina, de acordo com a Equação 3.10 (SCHMIDELL, 2001).

$$\mu_p = \frac{1}{X_m} \cdot \left( \frac{dP_m}{dt} \right) \quad (3.10)$$

Onde:

$P_m$  = massa de surfactina (mg)

t = tempo (h)

$X_m$  = massa celular (g)

$\mu_p$  = velocidade específica de produção de surfactina  
( $mg_{\text{surfactina}} \cdot g_{\text{células}}^{-1} \cdot h^{-1}$ )

### 3.8.2 Produtividade em Células e em Surfactina

Para os ensaios realizados em anaerobiose e em aeração superficial, as produtividades em células e surfactina foram determinadas a partir das concentrações de células e de surfactina obtidas diretamente do biorreator cujo volume do caldo de cultivo não variou.

Em relação aos ensaios conduzidos com aeração em profundidade, para os cálculos das produtividades em células e em surfactina considerou-se a quantidade de células ou produto obtidos em relação ao volume de reação, ou seja 5 L.

A produtividade em células foi determinada a partir da seguinte equação:

$$P_{xi} = \frac{X_i - X_0}{t_i} \quad (3.11)$$

Onde:

$P_{xi}$  = produtividade em células no tempo  $t_i$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$X_i$  = concentração de células no instante  $t_i$  relativa ao volume de reação de 5 L ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_0$  = concentração inicial de células relativa ao volume de reação de 5 L ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t_i$  = tempo para atingir  $X_i$  (h)

As concentrações de células foram calculadas dividindo as massas de células pelo volume de reação, que é de 5 L.

A produtividade em surfactina para cada tempo foi determinada pela seguinte equação:

$$P_{si} = \frac{P_i - P_0}{t_i} \quad (3.12)$$

Onde:

$P_{si}$  = produtividade em surfactina ocorrida no tempo  $t_i$  ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$P_i$  = concentração de surfactina no instante  $t_i$  relativa ao volume de reação de 5 L ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$P_0$  = concentração inicial de surfactina relativa ao volume de reação de 5 L ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$t_i$  = tempo no qual ocorreu  $C_i$  (h)

Nesse caso, as concentrações de surfactina ocorridas em cada tempo foram obtidas a partir da divisão das quantidades de surfactina pelo volume de reação (5L).

### 3.8.3 Fatores de Conversão

O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida plotando-se os dados da massa de células (g) em função da massa de substrato (g) observadas ao longo do processo fermentativo, de acordo com a Equação 3.13.

$$Y_{X/S} = \frac{X_m - X_{m0}}{S_{m0} - S_m} \quad (3.13)$$

Onde:

$X_m$  = massa de células em um dado instante t (mg)

$X_{m0}$  = massa inicial de células (mg)

$S_{m0}$  = massa inicial de substrato (g)

$S_m$  = massa de substrato presente no instante t (g)

O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado através do coeficiente angular da reta obtida plotando-se os dados da massa de surfactina (g) em função da massa de substrato (g), de acordo com a Equação 3.14.

$$Y_{P/S} = \frac{P_m - P_{m0}}{S_{m0} - S_m} \quad (3.14)$$

Onde:

$P_m$  = massa de surfactina em um dado instante t (mg)

$P_{m0}$  = massa inicial de surfactina (mg)

$S_{m0}$  = massa inicial de substrato (g)

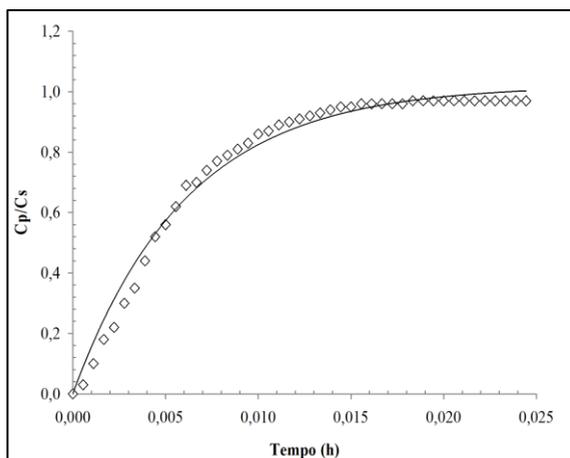
$S_m$  = massa de substrato presente no instante t (g)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação da constante de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido

Na Figura 4.1 estão representados os dados de  $C_p/C_s$  em função do tempo. A constante de atraso do eletrodo de oxigênio foi determinada a partir do ajuste da Equação 3.2 aos dados experimentais, utilizando o *software Statistica*. Foram realizadas três repetições deste teste para da determinação da constante de atraso.

Figura 4.1 Resposta do eletrodo ( $C_p$ ) em função do tempo ( $t$ ) para a determinação da constante de atraso do eletrodo ( $k_p$ ).



A equação de ajuste obtida para os dados experimentais é dada por:

$$\frac{C_p}{C_s} = 1 - e^{-174t}$$

Onde:

$C$  = Concentração real de oxigênio ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$C_p$  = sinal do eletrodo ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$k_p$  = Constante de atraso do eletrodo ( $h^{-1}$ )

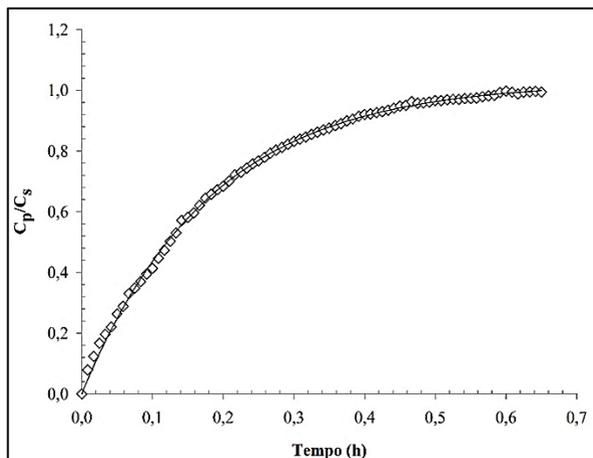
Dessa forma, verifica-se que a constante de atraso da sonda utilizada é igual a  $k_p = 174 h^{-1}$ .

A partir do gráfico acima, é possível ainda observar que a sonda permitiu a obtenção de 90% da resposta em 40 segundos (aproximadamente 0,011 h), no teste degrau. Segundo Schmidell (2001), uma sonda razoavelmente rápida permite a obtenção de 90% da resposta em apenas 20 segundos, o que sugere que há a necessidade de efetuar correções dos valores de  $k_{L,a}$  utilizando a Equação 3.5, a fim de estimá-los com maior precisão.

## 4.2 Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio

Os valores de  $k_{L,a}$  foram obtidos ajustando a Equação 3.5 aos dados experimentais de  $C_p/C_s$  em função do tempo, com o auxílio do *software Statistica*. Na Figura 4.2 estão representados os dados experimentais para a determinação do  $k_{L,a}$  nas condições de 0,2 vvm de aeração e 100 rpm de agitação.

Figura 4.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) nas condições de 0,2 vvm de aeração e 100 rpm de agitação.



Para este caso, através do ajuste da equação 3.5 aos dados experimentais, utilizando o *software Statistica*, resulta:

$$\frac{C_p}{C_s} = 1 + \frac{8,5}{174 - 8,5} * e^{-174,t} - \frac{174}{174 - 8,5} * e^{-8,5,t}$$

Da equação acima obtém-se o valor de  $k_{L,a}$  de  $8,5 \text{ h}^{-1}$ . O mesmo procedimento foi realizado para os demais casos, sendo que as figuras relativas a esses casos estão apresentadas no Apêndice A, e os resultados obtidos se encontram na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Valores de  $k_{L,a}$  obtidos para diferentes condições de agitação e aeração em um reator de 7 L com volume útil de 5L.

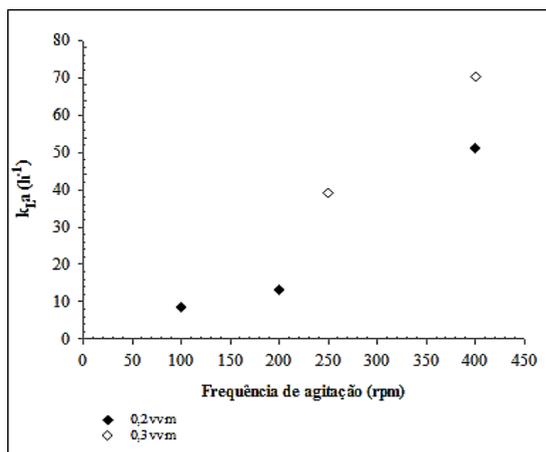
Tipo de Aeração	Vazão de aeração (vvm)	Frequência de Agitação (rpm)	$k_{L,a}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
Superficial	1,0	500	2,4
Profundidade	0,2	100	8,5
Profundidade	0,2	200	13,3
Profundidade	0,2	400	51,2
Profundidade	0,3	250	39,2
Profundidade	0,3	400	70,3

A partir da Tabela 4.1, verifica-se que o menor coeficiente de transferência de oxigênio foi obtido para a condição de aeração superficial. Isso se deve ao fato de que nesse caso o oxigênio só consegue penetrar através da superfície do meio líquido.

Quando se transferiu oxigênio através do borbulhamento de ar, ou seja, quando se utilizou o método de aeração em profundidade, promoveu-se uma melhor transferência de oxigênio, pois houve uma maior distribuição de bolhas de ar no seio líquido, aumentando, dessa forma, a área de transferência da interface gás-líquido e consequentemente a disponibilidade do oxigênio.

A Figura 4.3 apresenta a dependência do  $k_{L,a}$  com a frequência de agitação, utilizando aeração submersa nas vazões de 0,2 e 0,3 vvm.

Figura 4.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio para diferentes frequências de agitação e vazões de aeração.



A partir da análise da Figura 4.3, é possível perceber que o aumento da frequência de agitação contribui significativamente para o aumento do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. Isso ocorre porque aumentando-se a frequência de agitação, reduz-se a espessura do filme líquido, ou seja, diminui-se a resistência associada ao transporte de oxigênio na película líquida. Além disso, ocorre um maior rompimento e dispersão das bolhas de ar, o que contribui para o aumento da área interfacial de transferência de massa e, conseqüentemente, da transferência de oxigênio.

Ozbek e Gayik (2001) também observaram resultados similares, quando realizaram um estudo da transferência de oxigênio em biorreator na ausência de microrganismos em água destilada. O coeficiente de transferência de oxigênio aumentou significativamente quando a frequência de agitação aumentou de 100 para 400 rpm.

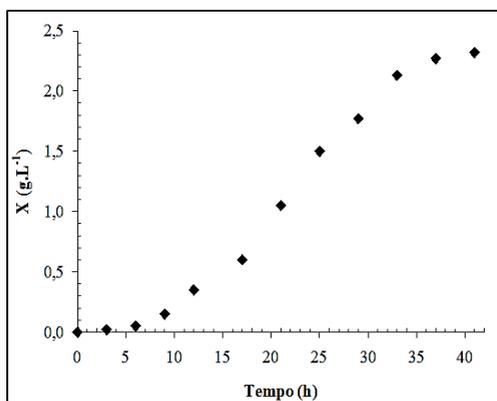
Westerterp, Van Dierendonck e De Kraa (1963) investigaram a influência da frequência de agitação na taxa de absorção específica de oxigênio e os resultados mostraram que o uso de baixas frequências de agitação não contribuem para o aumento da taxa específica de absorção. Além disso, esses autores identificaram uma certa frequência de agitação, a partir da qual a taxa de absorção específica aumenta rapidamente e linearmente com a frequência de agitação.

### 4.3 Cultivo em agitador orbital para a definição do tempo de incubação do inóculo

O tempo de incubação do inóculo foi estabelecido através de um estudo cinético do crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 em agitador orbital, e foi utilizado nos ensaios posteriores.

A Figura 4.4 apresenta a cinética de crescimento do *B. subtilis* ATCC 21332 em agitador orbital.

Figura 4.4 Concentração celular de *B. subtilis* ATCC 21332 em função do tempo em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C.



De acordo com a Figura 4.4, a concentração máxima de biomassa, expressa em gramas de matéria seca por litro de meio, foi de 2,32 g.L<sup>-1</sup> após 41 h de cultivo. Kim et al. (1997) cultivaram *Bacillus subtilis* C9 para a produção de surfactina em agitador orbital, utilizando meio composto por 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose, obtendo uma concentração celular máxima de 5,5 g.L<sup>-1</sup>. Esse resultado foi superior ao obtido no presente ensaio, entretanto, esses autores utilizaram uma concentração inicial de substrato quatro vezes maior do que a encontrada no presente ensaio, e obtiveram uma concentração celular apenas duas vezes maior.

Observando ainda a Figura 4.4, nota-se que a fase exponencial de crescimento ocorreu logo no início do cultivo. Dessa forma, o tempo de incubação do inóculo foi estabelecido em 24 h, período no qual as células estavam em fase de desaceleração do crescimento.

#### 4.4 Cultivos em biorreator

Para a realização do estudo cinético da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, foi necessário conduzir ensaios em biorreator. A partir desse estudo cinético, feito em termos de crescimento celular, consumo da glicose e produção de biosurfactante, foi possível avaliar a influência da transferência de oxigênio na produção do produto de interesse.

Além dos ensaios realizados em condição de aerobiose, também se conduziu um ensaio em anaerobiose para comparação.

##### 4.4.1 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Anaeróbio

Conforme descrito no item 3.8.1.1, todos os dados de crescimento celular, do consumo de glicose e da produção de surfactina foram calculados em massa a partir do volume de reação de 5 L.

Na Tabela 4.2 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no caldo de cultivo presente no biorreator, e os dados da biomassa calculados em massa, para ensaio realizado em anaerobiose.

Tabela 4.2 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo em anaerobiose em um volume de reação de 5L.

Tempo (h)	X no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_m$ no reator (g)
0	0,05	0,25
3	0,07	0,35
6	0,50	2,50
9	0,98	4,90
12	1,25	6,25
15	1,30	6,50
18	0,92	4,60
21	0,65	3,25

De acordo com a Tabela 4.2, verifica-se que a máxima quantidade de biomassa produzida foi de 6,50 g em um volume de

reação de 5L, o que equivale a uma concentração celular máxima de  $1,30 \text{ g.L}^{-1}$ , alcançada após 15 horas de cultivo. Esse resultado foi superior ao de  $0,856 \text{ g.L}^{-1}$ , obtido por Willenbacher et al. (2015) durante o cultivo de *Bacillus subtilis* DSM 10<sup>T</sup> em meio contendo 10 g/L de glicose e sob condições anaeróbias.

Debon (2015) cultivou *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em anaerobiose utilizando um meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, e obteve uma concentração celular máxima de  $1,22 \text{ g.L}^{-1}$  após 14 h de cultivo, sendo esse resultado muito próximo ao obtido no presente ensaio.

Lin et al. (1991) cultivaram *Bacillus licheniformis* JF-2 em biorreator anaeróbico em meio composto por  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e encontraram uma concentração celular máxima de  $0,714 \text{ g.L}^{-1}$ . Apesar de esse cultivo ter sido realizado em meio definido com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, a concentração celular máxima alcançada mostrou-se inferior à obtida no presente estudo.

Na Tabela 4.3, estão apresentados os dados da glicose em concentração, obtidos a partir do caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da glicose calculados em massa, para o ensaio realizado em anaerobiose.

Tabela 4.3 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em anaerobiose em um volume de reação de 5 L.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$S_m$ no reator (g)
0	12,86	64,29
3	10,54	52,71
6	9,50	47,49
9	7,21	36,09
12	3,93	19,65
15	1,31	6,53
18	0,13	0,64
21	0,12	0,60

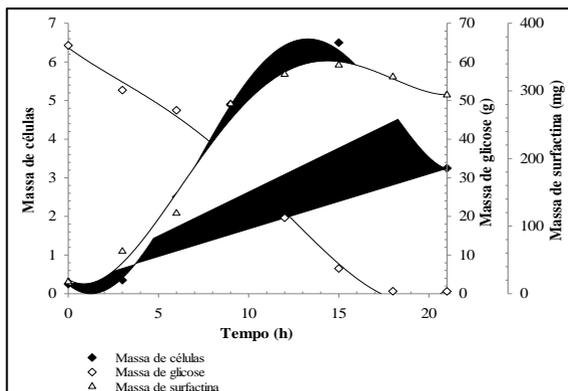
Na Tabela 4.4, estão apresentados os dados de produção de surfactina em concentração, obtidos a partir do caldo de cultivo presente no biorreator, e os dados da surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado em anaerobiose.

Tabela 4.4 Dados da produção de surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em anaerobiose em um volume de reação de 5 L.

Tempo (h)	P no reator ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$P_m$ no reator (mg)
0	3,50	17,5
3	12,5	62,4
6	23,8	118,8
9	56,2	280,8
12	64,9	324,4
15	67,6	338,2
18	64,1	320,7
21	58,8	293,9

Na Figura 4.5 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo da glicose e da produção de surfactina para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio.

Figura 4.5 Evolução do crescimento celular, do consumo de glicose e da produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Office Excel* 2013.



A partir da Tabela 4.5 e da Figura 4.5, nota-se que a surfactina foi produzida desde o início do processo, sendo que a máxima massa de surfactina encontrada foi de 338,2 mg em um volume de reação de 5L, resultando em uma concentração máxima de  $67,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 15 h de cultivo.

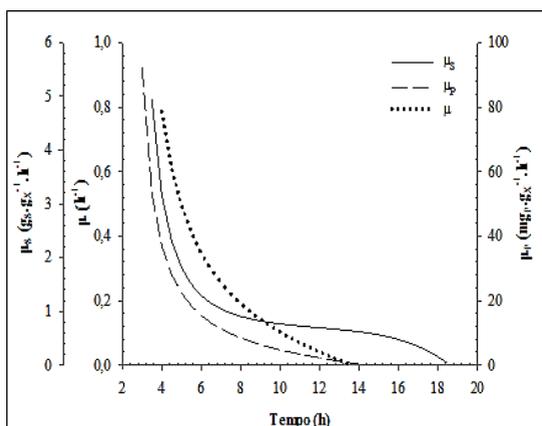
Youssef et al. (2007) avaliaram a produção anaeróbia de biossurfactante utilizando como meio de cultivo água de formação (água produzida na extração de petróleo), suplementada com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e um inóculo composto por uma mistura das cepas *Bacillus* RS-1 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049. Os resultados mostraram que a concentração média de biossurfactante produzido foi de  $90 \text{ mg.L}^{-1}$ , e este valor foi superior ao encontrado no presente estudo.

Cultivando *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina a partir de um meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, Debon (2015) encontrou uma concentração máxima de surfactina de  $29,5 \text{ mg.L}^{-1}$  após 16 h de cultivo. Esse resultado foi menor do que o encontrado no presente ensaio, o que pode ter ocorrido em função do meio de cultivo empregado ter sido diferente.

Yakimov et al. (1995), através do cultivo anaeróbio de *Bacillus licheniformis* BAS50 em meio definido contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, obtiveram uma produção de  $160 \text{ mg.L}^{-1}$  do biossurfactante lichenisina A. Esse resultado foi superior ao obtido no presente trabalho ( $67,64 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o que pode ter ocorrido em função da concentração inicial de glicose utilizada por Yakimov et al. (1995) ter sido duas vezes maior do que a utilizada no presente estudo ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Na Figura 4.6 estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de surfactina, em relação ao tempo de cultivo.

Figura 4.6 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido em anaerobiose.



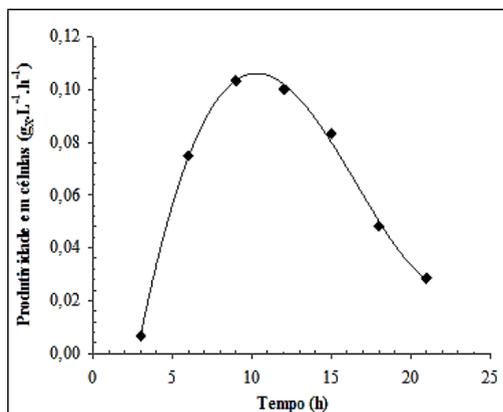
De acordo com a Figura 4.6, verifica-se que as curvas de velocidade específica de produção e de crescimento apresentaram perfis semelhantes ao longo do cultivo, o que sugere que a produção de surfactina é associada ao crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

Conforme apresentado no item 3.8.1.2, para o ensaio conduzido em anaerobiose, as concentrações celulares e as concentrações de surfactina em cada tempo foram determinadas a partir do volume do caldo de cultivo do biorreator, pois não houve variação do mesmo ao longo do cultivo.

Através dos dados de concentração celular, apresentados na Tabela 4.2, foi possível então determinar a produtividade em células por meio da Equação 3.11.

Na Figura 4.7 encontra-se a evolução da produtividade em células ao longo do cultivo.

Figura 4.7 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob anaerobiose.

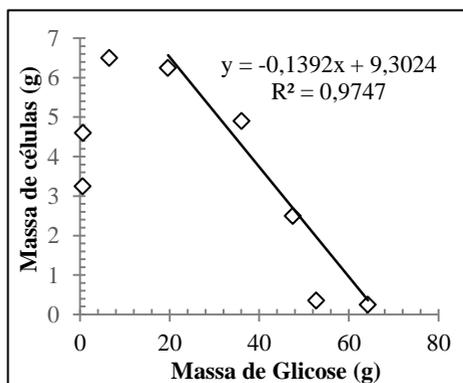


De acordo com a Figura 4.7, a máxima produtividade em células foi de  $0,103 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , obtida após 9 h de cultivo. Essa produtividade em células foi superior àquela obtida por Youssef et al. (2007) em condição anaeróbia. Esses autores cultivaram juntamente as cepas *Bacillus* RS-1 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 para a produção de biosurfactante, utilizando como meio de cultivo água de formação suplementada com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, e reportaram uma produtividade em células de  $0,030 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 48 h de cultivo.

Debon (2015), cultivando *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina em meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, obteve uma produtividade em células de  $0,074 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , e esse valor foi inferior ao encontrado no presente ensaio.

Na Figura 4.8 estão apresentados os dados de massa de células em função da massa de substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.8 Relação entre o crescimento celular e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.



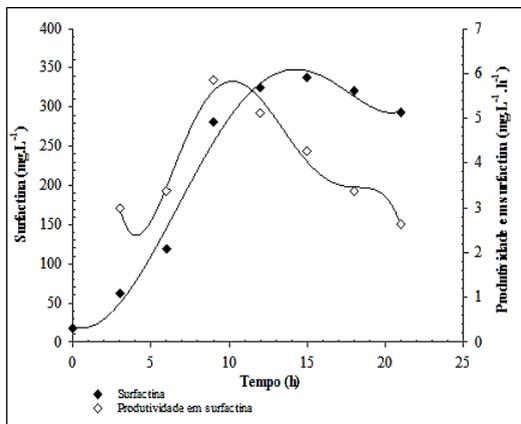
Através da Figura 4.8, verifica-se que o fator de conversão do substrato em células foi de  $0,1392 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Esse resultado foi muito próximo ao  $Y_{X/S}$  de  $0,13 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$  obtido por Lin et al. (1991) durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* JF-2 para a produção de biosurfactante, sob condição anaeróbia e em meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose.

Segundo Lin et al. (1991) baixos valores do fator de conversão do substrato em células, podem ser explicados pelo fato que a maior parte do carbono consumido é utilizado para a produção de outros produtos, tais como o ácido lático e o acetato.

A partir dos dados de concentração de surfactina, apresentados na Tabela 4.4, foi possível calcular as produtividades em surfactina para cada tempo, utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.9 encontra-se a evolução da concentração de surfactina e da produtividade ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.9 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido em anaerobiose. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos no *software Microsoft Excel* 2013.



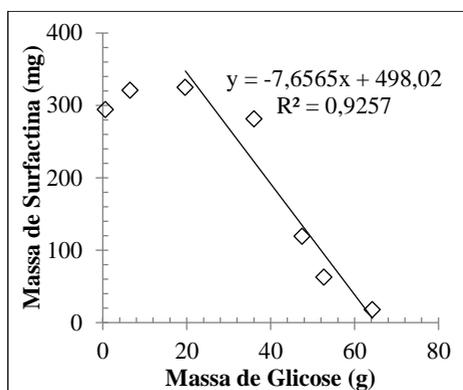
Observando a Figura 4.9, verifica-se que a máxima produtividade em surfactina foi de  $5,85 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrada após 9 h de cultivo. No entanto, o máximo valor de concentração de surfactina ocorreu no instante 15 h, ou seja, após as 9 h, a concentração de surfactina ainda continuou aumentando, indicando que a região de altas produtividades não coincidiu com a região de altas concentrações de surfactina.

Yakimovi et al. (1997) cultivaram 4 cepas de *Bacillus licheniformis* em meio contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, a fim de produzir biosurfactante em anaerobiose para aplicação na MEOR *in situ*. Dentre as cepas utilizadas, a BAS50 foi a que obteve maior concentração de biosurfactante,  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  após 22 h de cultivo, resultando em uma produtividade máxima de  $2,27 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Comparando-se esse resultado com o obtido neste trabalho, observa-se que no presente estudo foi possível obter uma maior produtividade máxima com metade da concentração inicial de substrato.

Na Figura 4.10, estão apresentados os dados de massa de surfactina obtida em função da massa de substrato. O fator de conversão

de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.10 Relação entre a massa de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em anaerobiose.



Observando a Figura 4.10, nota-se que o  $Y_{P/S}$  encontrado foi de  $7,66 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Yousef et al. (2007) obtiveram um  $Y_{P/S}$  de  $11,5 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$  quando cultivaram as cepas *Bacillus* RS-1 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 para a produção de biossurfactante em condição anaeróbia, utilizando água de formação como meio de cultivo suplementada com  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glicose.

#### 4.4.2 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Operado sob Aeração Superficial

As condições de aeração e agitação utilizadas no ensaio realizado com aeração superficial foram  $1,0 \text{ vvm}$  e  $500 \text{ rpm}$ . Conforme apresentado no item 3.8.1.1, todos os dados de crescimento celular, do consumo de glicose e da produção de surfactina foram calculados em massa a partir do volume de reação de  $5 \text{ L}$ .

Na Tabela 4.5 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no caldo de cultivo presente no biorreator, e

os dados da biomassa calculados em massa, para ensaio realizado com aeração superficial.

Tabela 4.5 Dados da biomassa em concentração ( $X$ ) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo em aeração superficial em um volume de reação de 5 L.

Tempo (h)	$X$ no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_m$ no reator (g)
0	0,06	0,28
3	0,31	1,53
6	0,59	2,93
9	0,96	4,78
12	1,16	5,78
15	1,24	6,18
18	1,14	5,68
21	1,01	5,03
24	0,84	4,18

De acordo com a Tabela 4.5, a quantidade máxima de células produzidas foi de 6,18 g em um volume de reação de 5 L, o que resulta em uma concentração celular máxima de  $1,24 \text{ g.L}^{-1}$ , alcançada após 15 horas de cultivo.

Essa concentração celular máxima foi próxima à concentração celular máxima obtida no cultivo em anaerobiose, o que sugere que, durante o ensaio conduzido sob aeração superficial, as células cresceram praticamente em anaerobiose, pois muito pouco oxigênio deve ter sido transferido.

Na Tabela 4.6 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no caldo de cultivo presente no biorreator, e os dados de glicose calculados em massa, para o ensaio realizado com aeração superficial.

Tabela 4.6 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em aeração superficial em um volume de reação de 5 L.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$S_m$ no reator (g)
0	15,43	77,15
3	14,55	72,75
6	13,33	66,65
9	11,18	55,90
12	8,18	40,90
15	5,64	28,20
18	3,73	18,65
21	3,45	17,25
24	3,23	16,15

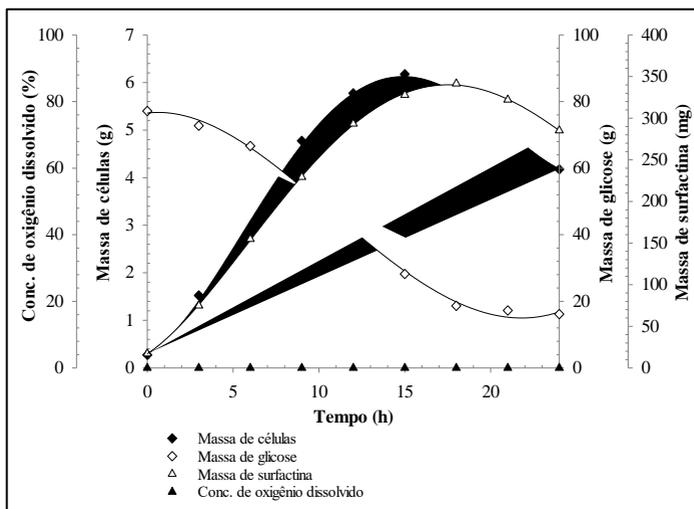
Na Tabela 4.7 estão apresentados os dados de produção de surfactina em concentração, obtidos a partir do caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados de surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado com aeração superficial.

Tabela 4.7 Dados da produção de surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em aeração superficial em um volume de reação de 5 L.

Tempo (h)	P no reator ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	P no reator (mg)
0	3,4	17,2
3	14,9	74,7
6	30,9	154,7
9	45,9	229,3
12	58,7	293,4
15	65,6	327,9
18	68,3	341,5
21	64,4	322,1
24	57,0	285,2

Na Figura 4.11 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob aeração superficial.

Figura 4.11 Evolução do crescimento celular, do consumo de glicose, concentração de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332, em biorreator conduzido sob aeração superficial. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Excel* 2013.

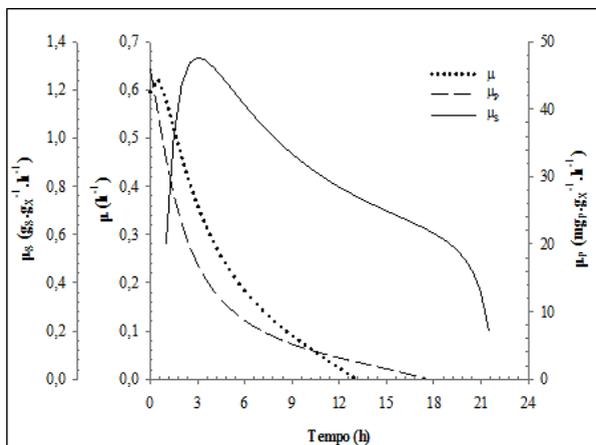


A partir da Figura 4.11, nota-se que o crescimento celular observado durante as primeiras 15 h de cultivo foi acompanhado pelo consumo mais acentuado de glicose. Após esse período, o microrganismo entrou em fase de declínio e o consumo de glicose diminuiu até cessar por volta das 24 h.

Conforme apresentado na Tabela 4.7 e na Figura 4.11, a quantidade máxima de surfactina produzida foi de 341,5 mg em um volume de reação de 5 L, o que resulta em uma concentração máxima do produto de  $68,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtida após 18 h de cultivo. Esse resultado foi muito próximo ao obtido no ensaio realizado em anaerobiose, que foi de  $67,6 \text{ mg.L}^{-1}$  em 15 h de cultivo.

Na Figura 4.12 estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento, de consumo da glicose e de produção de surfactina, em relação ao tempo de cultivo.

Figura 4.12 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_p$ ) em biorreator conduzido sob aeração superficial.



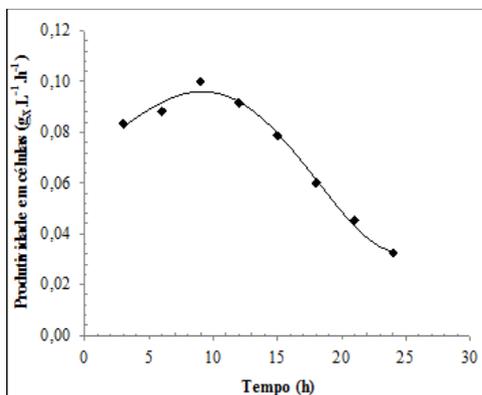
Analisando a Figura 4.12, nota-se que os maiores valores da velocidade específica de produção da surfactina e da velocidade específica de crescimento, encontram-se nos mesmos instantes do cultivo, indicando que a produção de surfactina é, de fato, associada ao crescimento celular. Da mesma forma, os valores mais elevados da velocidade específica de consumo do substrato, encontram-se também nessa região de elevadas velocidades de crescimento e produção do produto.

Conforme apresentado no item 3.8.1.2, para o ensaio conduzido sob aeração superficial, as concentrações celulares e as concentrações de surfactina em cada tempo foram determinadas a partir do volume do caldo de cultivo do biorreator, pois não houve variação do mesmo ao longo do cultivo.

A partir dos dados de concentração celular calculados com base na Tabela 4.5, foi possível calcular as produtividades em células para cada tempo, utilizando a Equação 3.11.

Na Figura 4.13 encontra-se a evolução produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

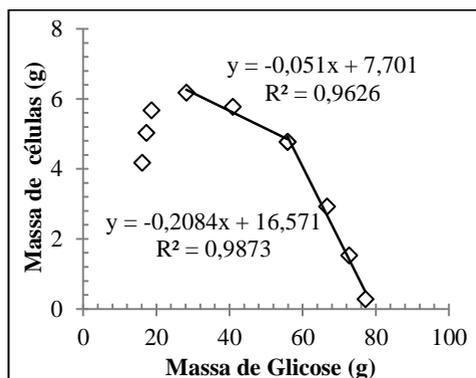
Figura 4.13 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob aeração superficial.



A partir da análise da Figura 4.13, nota-se que máxima produtividade em células encontrada para este cultivo foi de 0,100 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, após 9h de cultivo, embora a máxima concentração celular tenha sido obtida no tempo de 15 h. Esse resultado foi muito próximo ao de 0,103 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> obtido após 9h durante o ensaio realizado em anaerobiose, sugerindo que o crescimento celular sob condição anaeróbia deve ter prevalecido durante o presente cultivo.

Na Figura 4.14 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.14 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.

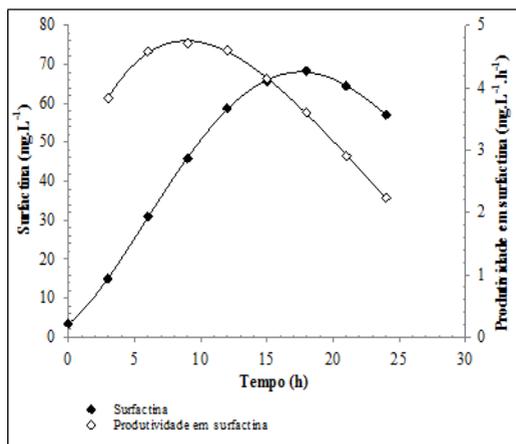


Através da Figura 4.14 nota-se que houve duas fases de consumo de substrato para o crescimento celular. A primeira fase, correspondente ao segundo trecho da curva e relativa às primeiras horas de cultivo, apresentou um fator de conversão do substrato em células foi de  $0,21 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Já a segunda fase, a qual encontra-se exibida no primeiro trecho do gráfico, apresentou um  $Y_{X/S}$  de  $0,05 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Nesse caso, o menor valor de  $Y_{X/S}$  observado na segunda fase pode estar relacionado à ocorrência de alguma limitação, como por exemplo, na disponibilidade de oxigênio dissolvido.

A partir dos dados de concentração de surfactina calculados com base na Tabela 4.7, foi possível calcular as produtividades em surfactina para cada tempo, utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.15 encontra-se a evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.15 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob aeração superficial.

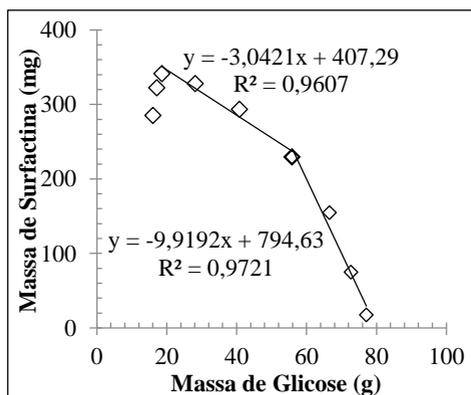


De acordo com a Figura 4.15, a produtividade máxima em surfactina foi de  $4,71 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrada após 9 h de cultivo. No entanto, a máxima concentração de surfactina ocorreu no instante 18 h. Esse resultado foi inferior ao de  $5,85 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , obtido durante o ensaio realizado em anaerobiose, indicando que a utilização de aeração superficial não contribuiu para a obtenção de maiores produtividades em relação ao cultivo em anaerobiose.

Conforme pode ser observado na Figura 4.15, as maiores produtividades em surfactina foram encontradas entre os instantes 3 h e 12 h, entretanto, as maiores concentrações de surfactina ocorreram após as 12 h de cultivo. Dessa forma, nota-se que a região de altas produtividades não coincidiu com a região de altas concentrações de surfactina, e embora tenha se alcançado a máxima produtividade no tempo 9 h, não se seria interessante parar o processo nesse instante.

Na Figura 4.16 estão apresentados os dados de massa de surfactina em função da massa de substrato. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.16 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em aeração superficial.



De acordo com a Figura 4.16, ocorreram duas fases distintas de consumo de substrato para a produção de surfactina. A primeira fase, correspondente ao segundo trecho do gráfico, ocorreu durante as primeiras horas de cultivo e apresentou um  $Y_{P/S}$   $9,92 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Já a segunda fase apresentou um  $Y_{P/S}$  de  $3,04 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Durante as primeiras horas de cultivo houve uma maior disponibilidade de oxigênio e por isso o fator de conversão do substrato em produto foi maior. Após esse período houve limitação de  $O_2$ , o que ocasionou um menor fator de conversão do substrato em produto.

#### 4.4.3 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e Produção de Surfactina em Biorreator Aerado em Profundidade

Os cultivos conduzidos com aeração submersa foram realizados de acordo com os coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) determinados anteriormente, conforme descrito no item 4.2. Assim para cada condição, ou seja, para cada  $k_L a$ , realizou-se um estudo cinético a fim de avaliar a influência da transferência de oxigênio na produção de surfactina.

#### **4.4.3.1 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator operado em $k_L a$ de $8,5 \text{ h}^{-1}$ (0,2 vvm e 100 rpm)**

A primeira condição estudada teve como referência o  $k_L a$  de  $8,5 \text{ h}^{-1}$ , obtido a partir de uma vazão de aeração de 0,2 vvm e uma frequência de agitação de 100 rpm. Conforme relatado anteriormente, o emprego de aeração submersa e agitação mecânica, a fim de promover a transferência de  $\text{O}_2$  durante o processo de produção de surfactina, ocasiona a formação de espuma.

No presente ensaio, a espuma começou a ser produzida por volta das 3 h de cultivo, o que provocou a diminuição do volume do caldo de cultivo no reator. A retirada dessa espuma foi feita através da linha de exaustão de ar, e o volume de líquido efluente foi estimado pela redução do volume no reator, sendo este valor também utilizado para o cálculo das massas de célula, glicose e surfactina que saíram do biorreator com a espuma. A partir do volume remanescente, foi possível também calcular as massas de X, S e P.

As massas de célula, glicose e surfactina foram determinadas tanto no volume de líquido efluente como no volume de líquido remanescente no reator em cada tempo. E por meio da soma dessas massas foi possível obter as quantidades totais de células, substrato e surfactina.

Na Tabela 4.8 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da biomassa calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tabela 4.8 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tempo (h)	X no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	X na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$X_m$ no reator (g)	$X_m$ na espuma (g)	$X_m$ total (g)
0	0,05		5000	0,25		0,25
1,5	0,15		5000	0,75		0,75
3,0	0,55	1,78	4840	2,66	0,28	2,94
4,5	0,88	1,75	4440	3,91	0,70	4,61
6,0	1,25	0,60	4200	5,25	0,14	5,39
7,5	1,43		4200	6,01		5,99
9,0	1,60		4200	6,72		6,72
10,5	1,83		4200	7,69		7,69
12,0	1,80		4200	7,56		7,56
13,5	1,75		4200	7,35		7,35
15,0	1,70		4200	7,14		7,14
16,5	1,65		4200	6,93		6,93

Observando a Tabela 4.8, verifica-se que foi coletado um volume total de 800 mL de espuma, sendo que na última coleta observou-se uma concentração celular de aproximadamente metade daquela presente biorreator. A quantidade máxima de células produzida foi de 7,69 g em um volume de reação de 5 L, o que resulta em uma concentração celular máxima de  $1,54 \text{ g.L}^{-1}$ , alcançada após 10,5 horas de cultivo.

Esse resultado foi superior ao reportado por Chen, Baker e Darton (2006), os quais obtiveram uma concentração celular máxima de  $0,52 \text{ g.L}^{-1}$  durante o cultivo de *Bacillus subtilis* BBK 006 em biorreator para a produção de surfactina, utilizando um meio de cultura contendo  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. Embora tenham conseguido manter a concentração de oxigênio dissolvido em 20% através de um controlador, esses autores utilizaram uma concentração de glicose inferior à utilizada no presente trabalho, o que explica a diferença nas máximas concentrações celulares obtidas.

Na Tabela 4.9 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo

presente no biorreator, assim como os dados da glicose calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tabela 4.9 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	S na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$S_m$ no reator (g)	$S_m$ na espuma (g)	$S_m$ total (g)
0	13,96		5000	69,81		69,81
1,5	13,13		5000	65,66		65,66
3,0	12,25	7,82	4840	59,29	1,25	60,54
4,5	10,90	8,74	4440	48,38	3,50	51,88
6,0	9,20	9,18	4200	38,64	2,20	40,84
7,5	7,10		4200	29,82		29,82
9,0	4,75		4200	19,95		19,95
10,5	2,39		4200	10,04		10,04
12,0	1,14		4200	4,79		4,79
13,5	0,80		4200	3,36		3,36
15,0	0,52		4200	2,18		2,18
16,5	0,51		4200	2,14		2,14

A partir da análise da Tabela 4.9, nota-se que a concentração de glicose no líquido efluente foi muito próxima àquela observada no mesmo instante no biorreator.

Na Tabela 4.10 estão apresentados os dados da surfactina em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, bem como os dados de surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tabela 4.10 Dados da produção de surfactina (P) em concentração e em massa para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Tempo (h)	P no reator (mg.L <sup>-1</sup> )	P na espuma (mg.L <sup>-1</sup> )	Volume no reator (mL)	P <sub>m</sub> no reator (mg)	P <sub>m</sub> na espuma (mg)	P <sub>m</sub> total (mg)
0	3,4		5000	16,9		16,9
1,5	6,0		5000	30,1		30,1
3,0	33,4	73,4	4840	161,7	11,7	173,4
4,5	34,6	94,2	4440	153,6	37,7	191,3
6,0	39,2	119,0	4200	164,6	28,6	193,2
7,5	45,5		4200	190,9		190,9
9,0	50,5		4200	212,0		212,0
10,5	42,0		4200	176,4		176,4
12,0	22,1		4200	92,9		92,9
13,5	10,2		4200	42,9		42,9
15,0	7,4		4200	31,1		31,1
16,5	4,2		4200	17,6		17,6

A partir da Tabela 4.10, nota-se que em todas as coletas efetuadas a concentração de surfactina no líquido efluente foi muito superior àquela obtida no mesmo instante dentro biorreator, sendo que a máxima concentração de surfactina obtida na espuma foi de 119,0 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto no reator a concentração era de 39,2 mg.L<sup>-1</sup>.

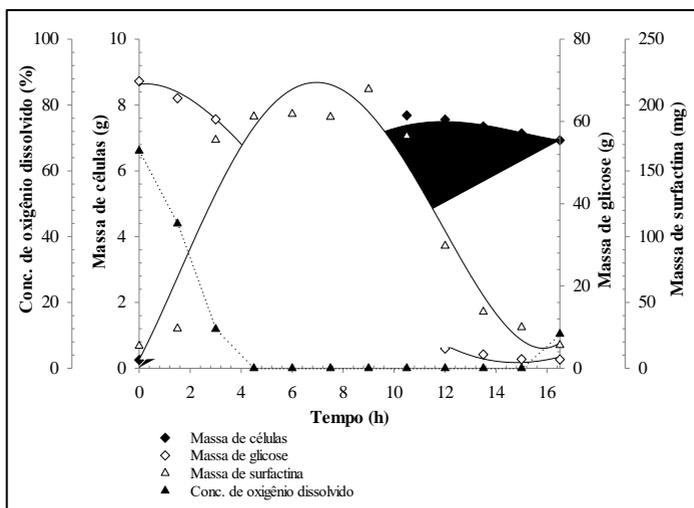
Conforme pode ser ainda observado na Tabela 4.10, a espuma começou a ser produzida por volta das 3 h e parou de ser formada depois das 6 h de cultivo. Chen, Baker e Darton (2006) observaram que a produção de espuma se iniciava quando a concentração de surfactina no biorreator excedia a Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual é de 10 mg.L<sup>-1</sup> para a surfactina, conforme relatado por Debon (2015).

Segundo Daltin (2011), quando uma solução de tensoativo, que se encontra acima de sua concentração micelar crítica, é agitada, pequenas bolhas de ar podem entrar na solução, gerando novas superfícies de água-ar. O tensoativo, organizado em micelas na solução, se desloca para essa nova superfície criada, recobrando-a. A bolha de ar, já recoberta de tensoativo, se dirige para a parte superior do sistema, empurrando, as bolhas mais antigas para cima, ou seja, o tensoativo

carrega a bolha de ar até a superfície, e assim se dá o processo de formação de espuma, a qual acaba extraindo o surfactante da solução para essa nova fase formada.

Na Figura 4.17 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Figura 4.17 Evolução do crescimento celular, do consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Excel* 2013.



Analisando a Figura 4.17, nota-se que, no início do processo, a concentração de oxigênio dissolvido estava próxima de 66% da saturação e por volta de 4 h esta concentração atingiu valores muito próximos a zero. Contudo, ainda foi possível observar um aumento na concentração celular até as 10,5 h de cultivo, indicando, assim, o crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 sob condição de limitação de  $O_2$ .

Davis, Lynch e Varley (1999) cultivaram *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, utilizando 1,0 vvm de aeração e 300 rpm de agitação, para a produção de surfactina. Durante o

ensaio, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima de 80% através de um sistema de controle e foi feito o uso de antiespumante, resultando em uma concentração celular máxima  $4,6 \text{ g.L}^{-1}$ , obtida após 14 h de cultivo. Essa concentração celular foi superior à encontrada no presente trabalho, o que pode ser justificado pelo fato de que o cultivo desses autores ter sido realizado sob condições suficientes de  $\text{O}_2$  e, por isso, mais energia foi obtida por meio da oxidação do substrato, proporcionando, assim, um maior crescimento celular. Entretanto, é importante ressaltar que quando se trabalha com um  $k_L$  variável a fim de manter uma determinada condição desejada, como foi o caso desses autores, é necessário um certo investimento em sistema de controle, ou seja, existe um custo envolvido na obtenção de elevadas concentrações celulares e conseqüentemente de elevadas produtividades.

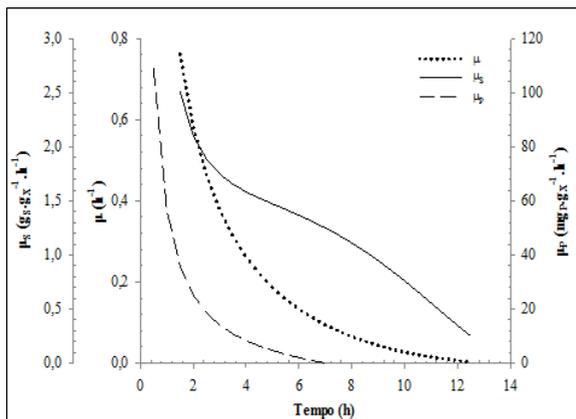
De acordo com a Tabela 4.10 e a Figura 4.17, a quantidade máxima de surfactina produzida foi de 212,0 mg em um volume de reação de 5L, o que resulta em uma concentração máxima de  $42,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 9 h de cultivo. Esse resultado foi superior ao de  $31,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtido por Davis, Lynch e Varley (1999) durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina em biorreator contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose.

Observando ainda a Figura 4.17, nota-se que houve uma maior produção de surfactina enquanto havia oxigênio dissolvido, sendo que a concentração de surfactina permaneceu praticamente constante após ter atingido seu máximo valor.

Segundo Guez et al. (2008), a concentração de oxigênio dissolvido desempenha um papel importante na produção de biosurfactante. Esses autores avaliaram a produção de surfactina, por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, sob diferentes condições de aeração em agitador orbital, utilizando um meio de cultura contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. A concentração máxima de surfactina obtida por esses autores foi de  $120 \text{ mg.L}^{-1}$ , a qual é superior à obtida no presente estudo. Isso pode ser explicado pelo fato deste cultivo ter sido conduzido sob condições limitadas de oxigênio, além da concentração inicial de glicose utilizada ter sido menor no presente ensaio.

Na Figura 4.18 encontra-se a evolução das velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicose e de produção de surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.18 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm.

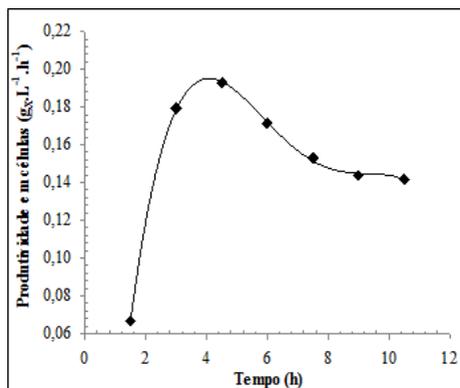


A partir da análise da Figura 4.18, nota-se que houve uma boa correlação entre as curvas de velocidade específica de produção e a de velocidade específica de crescimento, sugerindo que a produção de surfactina é realmente associada ao crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

Para o cálculo das produtividades em célula e em surfactina em cada instante, utilizaram-se os valores das massas totais de célula ou de produto (soma das massas encontradas no reator e no volume efluente), valores estes que foram divididos pelo volume de 5 L, ou seja, o volume de reação empregado.

Na Figura 4.19 encontra-se a evolução produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.19 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm.

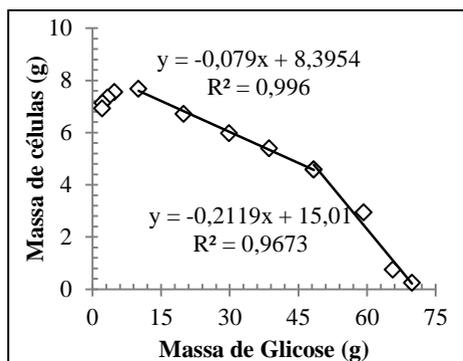


De acordo com a Figura 4.19, a máxima produtividade em células encontrada foi de  $0,193 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 4,5 h de cultivo. Esse resultado foi superior ao encontrado no ensaio realizado em anaerobiose, que foi de  $0,103 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 9 h de cultivo. Além disso, conforme apresentado anteriormente, a máxima concentração celular foi encontrada após 10,5 h de cultivo, indicando que embora a máxima produtividade em célula tenha sido obtida no instante 4,5 h, a concentração celular ainda aumentou até as 10,5 h.

Kim et al. (1997) cultivaram *Bacillus subtilis* C9 para a produção de biosurfactante em meio mineral contendo  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, em condição limitada de  $\text{O}_2$ , obtiveram uma produtividade em células de  $0,178 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Esse resultado foi inferior ao obtido no presente trabalho, embora a concentração inicial de substrato utilizada por Kim et al. (1997) tenha sido quatro vezes maior do que a utilizada no presente estudo ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Na Figura 4.20 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.20 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.

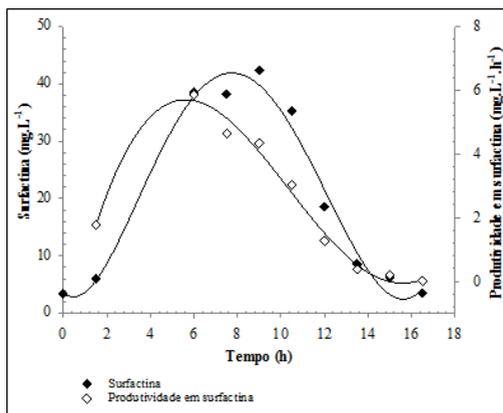


Observando a Figura 4.20, nota-se que houve a presença de duas fases distintas de consumo de substrato, sendo que a primeira, correspondente ao segundo trecho do gráfico, ocorreu durante as primeiras horas de cultivo e apresentou um fator de conversão de substrato em células de  $0,21 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Já a segunda fase, exibida no primeiro trecho do gráfico, apresentou um fator de conversão de substrato em células de  $0,08 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Verifica-se que o segundo trecho do gráfico corresponde à fase exponencial de crescimento celular, período no qual houve maior disponibilidade de  $\text{O}_2$ . Após esse período, o microrganismo passou a ser cultivado sob condição limitação de  $\text{O}_2$ , o que ocasionou um menor fator de conversão de substrato em células.

Conforme apresentado no item 3.8.1.2, a concentração de surfactina em cada tempo foi determinada a partir da massa total de surfactina (soma das massas encontradas no volume efluente com aquela obtida no biorreator), conforme apresentado na Tabela 4.10, em relação ao volume de reação de 5 L. Através das concentrações calculadas em cada tempo foi possível então calcular as produtividades em surfactina utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.21 estão apresentados os dados de concentração de surfactina e de produtividade em surfactina em função do tempo de cultivo.

Figura 4.21 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 100 rpm.



Através da análise da Figura 4.21, nota-se que a produção de surfactina cessou após 9 h de cultivo, sendo que entre 9 h e 12 h a concentração diminuiu drasticamente de 42,40 mg.L<sup>-1</sup> para 18,60 mg.L<sup>-1</sup>. Esta redução pode ser o resultado de uma reutilização da surfactina como substrato pelo microrganismo, já que esse declínio na concentração ocorreu quando praticamente toda a fonte de carbono já havia sido esgotada. Comportamento semelhante foi verificado por Chen, Baker e Darton (2006) e Guez et al. (2008). Entretanto, segundo Lin et al. (1991), durante a fase estacionária as células produzem enzimas extracelulares que afetam o biosurfactante, reduzindo sua concentração no meio de cultivo.

Ainda de acordo com a Figura 4.21, verifica-se que a máxima produtividade em surfactina encontrada foi de 5,88 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, encontrada após 6 h de cultivo. Essa produtividade foi semelhante à de 5,85 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> encontrada durante o cultivo realizado em anaerobiose, indicando que a condução do processo, nessas condições de aeração e agitação, não contribuiu significativamente para a obtenção de maiores produtividades. Entretanto é importante ressaltar que durante o presente ensaio, foi possível obter elevadas concentrações de surfactina na espuma removida.

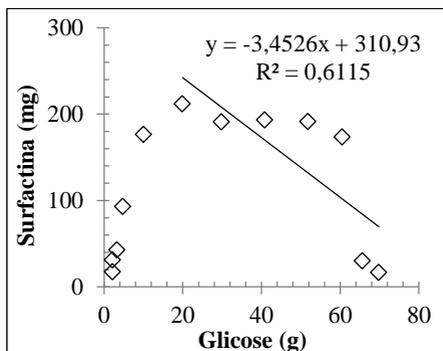
Além disso, a produtividade máxima em surfactina encontrada neste estudo foi superior à de 2,1 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, obtida por Davis, Lynch e Varley (1999) em 15 h de cultivo. Esses autores avaliaram a produção

de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em meio composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, em condições suficientes de O<sub>2</sub>. A partir desses resultados, verifica-se que o presente trabalho se mostrou mais eficiente, já que se obteve uma maior produtividade, mesmo sob condições limitadas de O<sub>2</sub>.

Chen, Baker e Darton (2006) estudaram a produção de surfactina a partir de *Bacillus subtilis* BBK 006 em agitador orbital, utilizando meio de cultivo contendo 2 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Esses autores encontraram uma produtividade em surfactina de 3,8 mg.L.h<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo. Comparando esse resultado com o obtido no presente trabalho, nota-se que o presente estudo obteve maior valor de produtividade, apesar de utilizar uma concentração inicial de substrato maior do que no cultivo de Chen, Baker e Darton (2006).

Na Figura 4.22 estão apresentados os dados de massa de surfactina em função da massa de substrato para a determinação do fator de conversão de substrato em produto (Y<sub>P/S</sub>).

Figura 4.22 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto (Y<sub>P/S</sub>) durante o cultivo realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm.



A partir da análise da Figura 4.22, nota-se que não ocorreu uma relação linear entre os dados de massa de surfactina e massa de glicose, logo não foi possível determinar o fator de conversão do substrato em produto graficamente.

#### 4.4.3.2 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator operado sob $k_L a$ de $13,3 \text{ h}^{-1}$ (0,2 vvm e 200 rpm)

A segunda condição estudada teve como referência um  $k_L a$  de  $13,3 \text{ h}^{-1}$ , obtido para as condições de 0,2 vvm de aeração e 200 rpm de agitação.

Nesse caso a espuma também começou a ser formada por volta das 3 h de cultivo, o que ocasionou a diminuição do volume do caldo de cultivo do reator, sendo a espuma removida através da linha de exaustão de ar.

Conforme apresentado anteriormente, foram determinadas as massas de célula, glicose e surfactina tanto no volume de líquido efluente como no volume de líquido remanescente no reator em cada tempo. E a partir da soma dessas massas foi possível obter as quantidades totais de células, substrato e surfactina.

Na Tabela 4.11 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da biomassa calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Tabela 4.11 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Tempo (h)	X no reator ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	X na espuma ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$X_m$ no reator (g)	$X_m$ na espuma (g)	$X_m$ total (g)
0	0,07		5000	0,35		0,35
1,5	0,25		5000	1,25		1,25
3,0	0,65	0,17	4858	3,16	0,024	3,18
4,5	0,88	0,20	4668	4,11	0,038	4,15
6,0	1,12	0,10	4430	4,96	0,024	4,98
7,5	1,35	0,15	4145	5,60	0,043	5,64
9,0	1,48	0,05	4050	5,99	0,005	6,00
10,5	1,62		4050	6,56		6,56
12,0	1,75		4050	7,09		7,09
13,5	1,80		4050	7,29		7,29
15,0	1,65		4050	6,68		6,68

Observando a Tabela 4.11, verifica-se que o máximo volume de espuma recolhido durante o ensaio foi de 0,285 L, entre o período de 6h e 7,5 h de cultivo, sendo o volume total retirado de 950 mL, observando-se também que a concentração celular obtida na espuma foi muito inferior àquela encontrada no reator. A quantidade máxima de células foi de 7,29 g, para o instante 13,5 h, e considerando o volume de reação de 5 L de meio, resulta em uma concentração celular máxima de  $1,46 \text{ g.L}^{-1}$ , alcançada após 13,5 horas de cultivo.

Silva et al. (2015) encontraram uma concentração celular máxima de  $1,95 \text{ g.L}^{-1}$  durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ITP-001 para a produção de surfactina em biorreator contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de amido, utilizando uma vazão de aeração de 1,0 vvm e uma frequência de agitação de 200 rpm. Esse resultado foi superior ao obtido no presente ensaio, o que pode ser justificado pela maior concentração inicial de substrato empregada por esses autores.

Na Tabela 4.12 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, bem como os dados da glicose calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Tabela 4.12 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	S na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$S_m$ no reator (g)	$S_m$ na espuma (g)	$S_m$ total (g)
0	11,91		5000	59,55		59,55
1,5	11,06		5000	55,30		55,30
3,0	10,59	5,75	4858	51,45	0,82	52,27
4,5	9,77	4,10	4668	45,62	0,78	46,40
6,0	8,74	3,34	4430	38,72	0,79	39,51
7,5	6,32	6,27	4145	26,20	1,79	27,99
9,0	5,79	2,40	4050	23,45	0,23	23,68
10,5	4,21		4050	17,05		17,05
12,0	2,43		4050	9,84		9,84
13,5	0,57		4050	2,31		2,31
15,0	0,33		4050	1,34		1,34

De acordo com a Tabela 4.12, nota-se que a concentração de glicose no líquido efluente foi inferior àquela observada no mesmo instante no biorreator, sendo no tempo de 7,5 h a concentração de glicose na espuma muito próxima à obtida dentro reator.

Na Tabela 4.13 estão apresentados os dados da surfactina em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm.

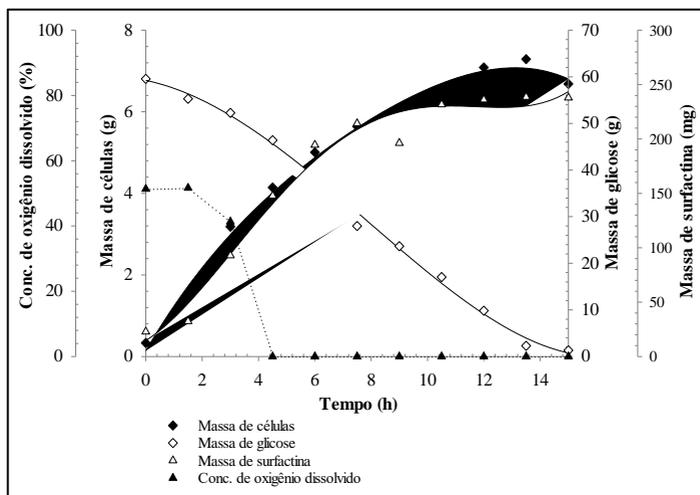
Tabela 4.13 Dados da surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Tempo (h)	P no reator ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	P na espuma ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$P_m$ no reator (mg)	$P_m$ na espuma (mg)	$P_m$ total (mg)
0	4,6		5000	22,8		22,8
1,5	6,5		5000	32,4		32,4
3,0	16,3	94,8	4858	79,3	13,5	92,8
4,5	26,9	116,2	4668	125,7	22,1	147,8
6,0	36,3	141,7	4430	160,9	33,7	194,6
7,5	38,0	198,5	4145	157,7	56,6	214,3
9,0	42,4	257,1	4050	171,8	24,4	196,2
10,5	57,2		4050	231,7		231,7
12,0	58,3		4050	236,2		236,2
13,5	58,9		4050	238,6		238,6
15,0	58,8		4050	238,0		238,0

A partir da Tabela 4.13, observa-se que em todas as coletas realizadas a concentração de surfactina no líquido efluente foi superior à encontrada no mesmo instante no biorreator. A máxima concentração de surfactina obtida na espuma foi de 257,1  $\text{mg.L}^{-1}$ , enquanto no reator esse valor era de apenas 42,4  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Na Figura 4.23 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 200 rpm.

Figura 4.23 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 200 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo *software Microsoft Excel* 2013.



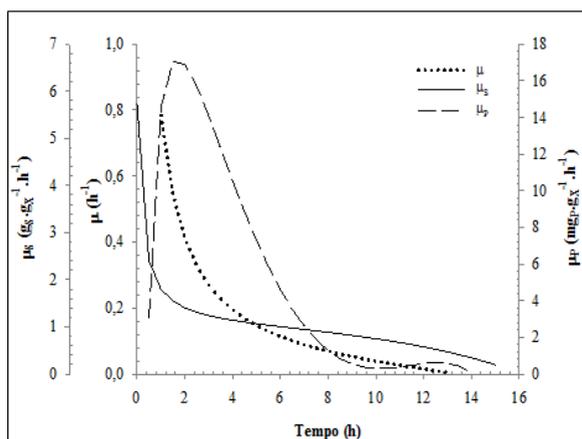
A partir da análise da Figura 4.23, nota-se que no início do processo a concentração de oxigênio dissolvido era de aproximadamente 50% em relação a saturação, e essa concentração atingiu valores muito próximos a zero por volta de 4,5 h de cultivo, quando o microrganismo se encontrava na fase exponencial de crescimento. No entanto, ainda foi possível observar um aumento na concentração celular até as 13,5 h de cultivo, indicando, assim, que *B. subtilis* ATCC 21332 cresceu sob condição de limitação de O<sub>2</sub> durante a maior parte do cultivo. É possível notar ainda, que a concentração de oxigênio dissolvido se manteve em 0%, mesmo não havendo mais crescimento celular, ou seja, quando o microrganismo já estava em fase estacionária de crescimento.

Observando a Tabela 4.13 e a Figura 4.23, nota-se que a quantidade máxima de surfactina produzida foi de 238,6 mg e, considerando o volume de reação de 5 L, resulta em uma concentração máxima de 47,7 mg.L<sup>-1</sup>, alcançada após 13,5 h de cultivo. Esse resultado foi superior ao de 42,4 mg.L<sup>-1</sup>, obtido durante o cultivo realizado sob 0,2 vvm e 100 rpm.

Davis, Lynch e Varley (1999) cultivaram *Bacillus subtilis* ATCC 21332, para a produção de surfactina em meio de cultura composto por 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Esse sistema foi operado com uma vazão de aeração de 0,5 vvm e uma frequência de agitação de 220 rpm, sendo que após 9 h de cultivo a concentração de oxigênio dissolvido atingiu 0%. Mesmo sob condições de limitação de O<sub>2</sub>, a glicose continuou sendo consumida pelo microrganismo, o que permitiu a obtenção de uma concentração máxima de surfactina de 41,3 mg.L<sup>-1</sup>, após 12 h.

Na Figura 4.24 encontram-se as velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicose e de produção de surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.24 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 200 rpm.



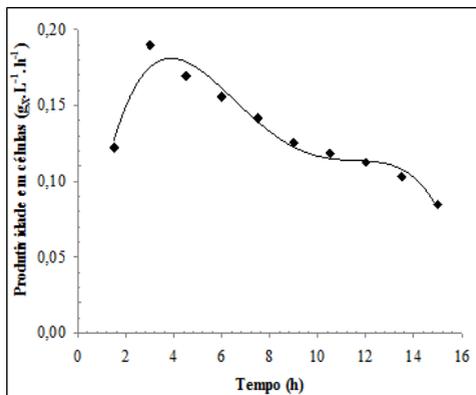
Através da análise da Figura 4.24, observa-se que as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e de produção ( $\mu_P$ ) apresentam perfis semelhantes, indicando que a produção de surfactina é realmente associada ao crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

Além disso, os maiores valores de  $\mu_P$  foram alcançados quando ocorreram as maiores velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_S$ ). Entretanto, as curvas de  $\mu_P$  e de  $\mu_S$  não exibiram perfis semelhantes, já que os valores de  $\mu_S$  caíram quase que linearmente com o tempo.

Através dos dados de concentração celular foi possível calcular as produtividades em células para cada tempo, utilizando a Equação 3.11, conforme apresentado no item 3.8.1.2.

Na Figura 4.25 encontra-se a evolução produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.25 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 200 rpm.

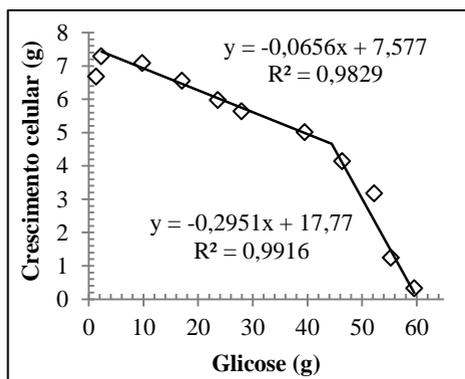


De acordo com a Figura 4.25, a máxima produtividade em células encontrada foi de  $0,190 \text{ g}_a\text{.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ , após 3 h. No entanto a máxima concentração celular foi encontrada no instante 13,5 h, ou seja, embora se tenha alcançado a máxima produtividade em células logo no início do cultivo, a concentração celular ainda aumentou até as 13,5 h. Essa máxima produtividade encontrada foi próxima a de  $0,193 \text{ g}_a\text{.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ , obtida durante o ensaio realizado sob as condições de 0,2 vvm e 100 rpm.

Davis, Lynch e Varley (1999), cultivando *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina em meio contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, em condições suficientes de  $\text{O}_2$ , obtiveram uma produtividade máxima em células de  $0,311 \text{ g}_a\text{.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ . Esse resultado foi superior ao obtido no presente trabalho, o que pode ter ocorrido em virtude da transferência de oxigênio ter sido mais eficiente no cultivo realizado por esses autores.

Na Figura 4.26 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.26 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.



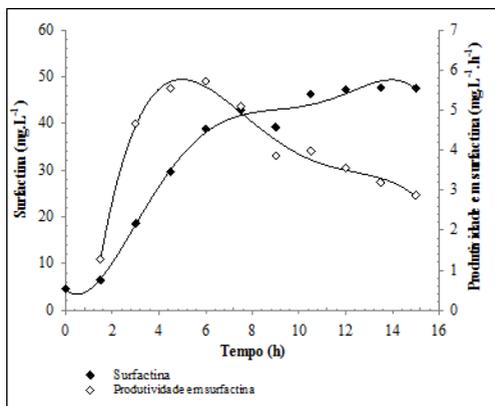
Analisando a Figura 4.26, nota-se que ocorreram duas fases distintas de consumo de substrato. A primeira fase, correspondente ao segundo trecho do gráfico, ocorreu durante as primeiras horas de cultivo e apresentou um fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,29 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Esse resultado foi superior ao observado durante o mesmo trecho no ensaio realizado sob  $0,2 \text{ vvm}$  e  $100 \text{ rpm}$ , o que pode ser explicado pelo fato de no presente cultivo o oxigênio estar mais disponível, contribuindo, assim, para que mais energia fosse obtida do substrato para o crescimento celular.

Já a segunda fase de consumo de substrato, apresentou um  $Y_{X/S}$  de  $0,066 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . É possível observar ainda que o segundo trecho do gráfico corresponde à fase exponencial de crescimento celular, período no qual houve maior disponibilidade de  $\text{O}_2$ . Após esse período, o microrganismo passou a ser cultivado sob condição de limitação de  $\text{O}_2$ , o que produziu um menor fator de conversão de substrato em células.

Conforme descrito no item 3.8.1.2, a concentração de surfactina em cada tempo foi determinada a partir da massa total de surfactina (soma das massas encontradas no volume efluente com aquela obtida no biorreator), de acordo com a Tabela 4.13, em relação ao volume de reação de 5 L. Através das concentrações calculadas em cada tempo foi possível calcular as produtividades em surfactina utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.27 estão apresentados os dados de concentração de surfactina e de produtividade em surfactina em função do tempo de cultivo.

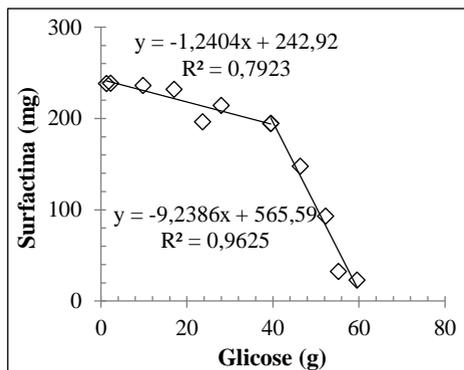
Figura 4.27 Evolução da concentração de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 200 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Excel* 2013.



De acordo com a Figura 4.27, a máxima produtividade em surfactina encontrada neste estudo foi de  $5,72 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 6 h de cultivo. No entanto, a máxima concentração de surfactina foi encontrada no instante 13,5 h, indicando que embora a máxima produtividade em surfactina tenha sido encontrada no tempo 6 h, a concentração de surfactina ainda aumentou até as 13,5 h. Além disso, essa máxima produtividade em surfactina obtida foi próxima à de  $5,88 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrado durante o cultivo sob 0,2 vvm e 100 rpm, apesar da frequência de agitação empregada ter sido maior.

Na Figura 4.28 estão apresentados os dados de massa de surfactina em função da massa de substrato. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.28 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm.



De acordo com a Figura 4.28, houve duas fases distintas de consumo de substrato para a produção de surfactina. A primeira fase, correspondente ao segundo trecho do gráfico, ocorreu durante as primeiras horas de cultivo e apresentou  $Y_{P/S} = 9,24 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . A segunda fase, relativa ao primeiro trecho do gráfico, apresentou  $Y_{P/S} = 1,24 \text{ mg}_{\text{biossurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Durante as primeiras horas de cultivo houve uma maior disponibilidade de oxigênio e por isso o fator de conversão do substrato em produto foi maior. Após esse período houve limitação de  $\text{O}_2$ , contribuindo para um menor fator de conversão do substrato em produto.

#### 4.4.3.3 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator operado sob $k_L a$ de $51,2 \text{ h}^{-1}$ (0,2 vvm e 400 rpm)

A terceira condição estudada teve como referência um  $k_L a$  de  $51,2 \text{ h}^{-1}$ , o qual foi determinado a partir das condições de 0,2 vvm de aeração e 400 rpm de agitação.

Durante o processo houve excessiva formação de espuma, o que ocasionou a diminuição do volume do caldo de cultivo do reator, sendo a espuma recolhida através da linha de exaustão de ar, e o volume de líquido efluente estimado pela redução do volume no reator.

Conforme descrito anteriormente, as massas de célula, glicose e surfactina foram determinadas tanto no volume de líquido efluente como no volume de líquido remanescente no reator em cada tempo. E a partir da soma dessas massas foi possível obter as quantidades totais de células, substrato e surfactina.

Na Tabela 4.14 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da biomassa calculados em massa.

Tabela 4.14 Dados da biomassa (X) em concentração e em massa para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm.

Tempo (h)	X no reator (g.L <sup>-1</sup> )	X na espuma (g.L <sup>-1</sup> )	Volume no reator (mL)	X <sub>m</sub> no reator (g)	X <sub>m</sub> na espuma (g)	X <sub>m</sub> total (g)
0	0,07		5000	0,35		0,35
1,5	0,15		5000	0,75		0,75
3,0	0,75	0,60	4812	3,61	0,113	3,72
4,5	1,07	0,25	4500	4,81	0,078	4,89
6,0	1,50	0,20	4062	6,09	0,088	6,18
7,5	1,80	0,25	3875	6,97	0,047	7,02
9,0	2,40	0,30	3750	9,00	0,037	9,04
10,5	3,00		3750	11,25		11,25
12,0	3,22		3750	12,07		12,07
13,5	3,08		3750	11,55		11,55

Observando a Tabela 4.14, nota-se que em todas as coletas a concentração celular foi inferior àquela encontrada no biorreator no mesmo instante, sendo 1250 mL o volume total de líquido retirado. A quantidade máxima de células produzidas foi de 12,08 g em um volume de reação de 5L, resultando em uma concentração celular máxima de 2,42 g.L<sup>-1</sup>, alcançada após 12 horas de cultivo. Esse resultado foi superior ao de 1,46 g.L<sup>-1</sup> obtido no ensaio realizado sob 0,2 vvm e 200 rpm, o que ocorreu em virtude da maior frequência de agitação empregada no presente ensaio, a qual promoveu uma melhor transferência de oxigênio.

Kim et al. (1997), cultivando *B. subtilis* C9 para a produção de biossurfactante, em meio mineral composto por 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose, sob condições de 1,0 vvm e 300 rpm, encontraram uma concentração celular máxima de 3,4 g.L<sup>-1</sup>. Esse resultado foi superior ao obtido no presente cultivo, e esta diferença está relacionada com a melhor transferência de oxigênio promovida durante o cultivo realizado por esses autores, e com a maior concentração inicial de substrato, uma vez que, a concentração de glicose foi 4 vezes maior que a utilizada no presente estudo.

Na Tabela 4.15 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da glicose calculados em massa.

Tabela 4.15 Dados da glicose (S) em concentração e em massa para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm.

Tempo (h)	S no reator (g.L <sup>-1</sup> )	S na espuma (g.L <sup>-1</sup> )	Volume no reator (mL)	S <sub>m</sub> no reator (g)	S <sub>m</sub> na espuma (g)	S <sub>m</sub> total (g)
0	13,54		5000	67,70		67,70
1,5	12,10		5000	60,50		60,50
3,0	11,64	9,73	4812	56,01	1,83	57,84
4,5	10,43	9,05	4500	46,93	2,82	49,75
6,0	7,75	7,50	4062	31,48	3,28	34,76
7,5	5,74	4,95	3875	22,24	0,92	23,16
9,0	4,12	3,67	3750	15,45	0,46	15,91
10,5	2,96		3750	11,10		11,10
12,0	1,94		3750	7,27		7,27
13,5	1,55		3750	5,81		5,81

A partir da Tabela 4.15, observa-se que em todas as coletas a concentração de glicose no líquido efluente foi próxima àquela observada no mesmo instante no biorreator.

Na Tabela 4.16 estão apresentados os dados da surfactina em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, e os dados da surfactina calculados em massa.

Tabela 4.16 Dados da produção de surfactina em concentração e em massa para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,2 vvm e 400 rpm.

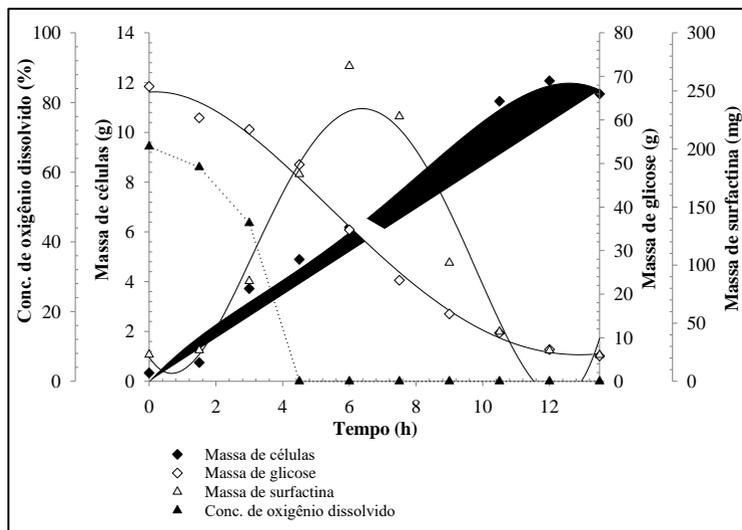
Tempo (h)	P no reator (mg.L <sup>-1</sup> )	P na espuma (mg.L <sup>-1</sup> )	Volume no reator (mL)	P <sub>m</sub> no reator (mg)	P <sub>m</sub> na espuma (mg)	P <sub>m</sub> total (mg)
0	4,6		5000	22,9		22,9
1,5	5,3		5000	26,7		26,7
3,0	13,6	110,2	4812	65,5	20,7	86,2
4,5	28,5	159,9	4500	128,4	50,0	178,4
6,0	44,7	205,1	4062	181,7	89,7	271,4
7,5	47,5	235,4	3875	183,9	44,1	228,0
9,0	17,6	288,4	3750	65,9	36,0	101,9
10,5	11,4		3750	42,6		42,6
12,0	7,1		3750	26,5		26,5
13,5	6,0		3750	22,6		22,6

A partir da Tabela 4.16, nota-se que em todas as coletas realizadas a concentração de surfactina no líquido efluente foi superior à encontrada no mesmo instante no biorreator, sendo 288,4 mg.L<sup>-1</sup>, a máxima concentração de surfactina encontrada na espuma, enquanto no reator nesse mesmo instante a concentração era de 17,6 mg.L<sup>-1</sup>.

Cooper et al. (1981), durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina, verificaram que a maior parte do biossurfactante produzido estava presente na espuma, sendo que muito pouco foi encontrado no caldo de cultivo remanescente no reator. Além disso, esses autores observaram que a remoção da espuma estimulou a produção de mais surfactina, uma vez que a coleta contínua da espuma proporcionou bons rendimentos do produto.

Na Figura 4.29 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 400 rpm.

Figura 4.29 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Excel* 2013.



A partir da Figura 4.29, nota-se que no início do processo a concentração de oxigênio dissolvido era de aproximadamente 67% em relação a saturação, e essa concentração atingiu valores muito próximos a zero por volta de 4,5 h de cultivo. Dessa forma, a partir das 4,5 h o processo foi conduzido sob condição limitada de oxigênio. Entretanto, *B. subtilis* ATCC 21332 foi capaz de crescer mesmo com pouca disponibilidade de  $O_2$ , uma vez que foi possível observar um aumento na concentração celular até as 12 h de cultivo.

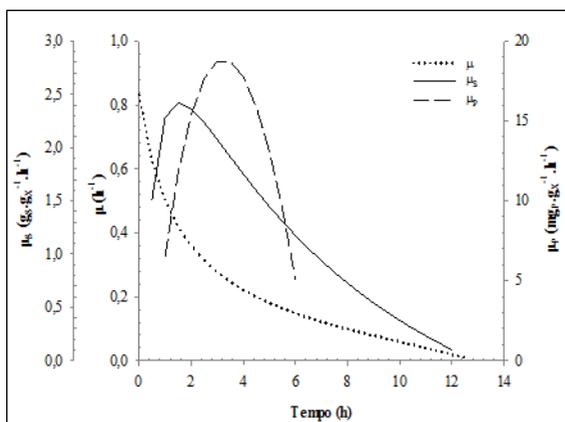
De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.16 e na Figura 4.29, a máxima quantidade de surfactina produzida foi de 271,4 mg em um volume de reação de 5L, o que resulta em uma concentração máxima de  $54,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 6 h de cultivo. Observando ainda a Figura 4.29, verifica-se que após 6 h de cultivo a produção de surfactina caiu bruscamente, embora ainda houvesse glicose no meio e estivesse ocorrendo o crescimento celular.

Davis, Lynch e Varley (1999) avaliaram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio de cultura composto por 40

$\text{g.L}^{-1}$  de glicose, utilizando uma vazão de aeração de 1,0 vvm e uma frequência de agitação de 300 rpm. Após 10 h de cultivo a concentração de oxigênio dissolvido atingiu 0%, e partir desse período a surfactina começou a ser produzida, alcançando uma concentração máxima de  $53,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 60 h de cultivo. Embora a concentração máxima de surfactina obtida por esses autores tenha sido próxima a encontrada no presente ensaio, é preciso ressaltar que o tempo necessário para alcançar a concentração máxima de surfactina foi muito superior. Além disso, a concentração inicial de glicose foi quatro vezes maior que a utilizada no presente trabalho.

Na Figura 4.30 está apresentada a evolução das velocidades específicas de crescimento, consumo de glicose e de produção de surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.30 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,2 vvm e 400 rpm.

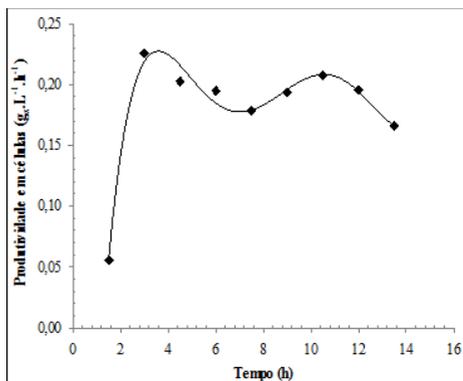


Observando a Figura 4.30, nota-se que as curvas de  $\mu$ ,  $\mu_P$  e  $\mu_S$  não apresentaram perfis semelhantes ao longo de todo o tempo de cultivo. Durante as primeiras horas de cultivo as curvas de  $\mu_P$  e  $\mu_S$  exibiram uma boa correlação, a seguir observou-se que a velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) caiu quase que linearmente com o tempo, enquanto a velocidade específica de produção diminuiu significativamente até as 6 h de cultivo.

Através dos dados de concentração celular foi possível calcular as produtividades em células para cada tempo, utilizando a Equação 3.11, conforme apresentado no item 3.8.1.2.

Na Figura 4.31 encontra-se a evolução produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

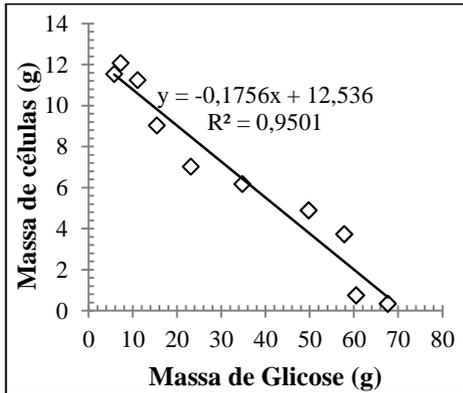
Figura 4.31 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 400 rpm.



A partir da Figura 4.31, nota-se que a máxima produtividade em células obtida foi de  $0,226 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , em 3 h de cultivo, apesar da máxima concentração celular ter sido obtida no tempo 12 h. Esse resultado foi superior ao encontrado no ensaio realizado sob as condições de 0,2 vvm e 200 rpm, que foi  $0,190 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Essa maior produtividade encontrada é resultado da maior frequência de agitação utilizada no presente ensaio, a qual foi responsável por promover uma melhor transferência de oxigênio contribuindo, assim, para a obtenção de maiores valores da concentração celular.

Na Figura 4.33 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.32 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.

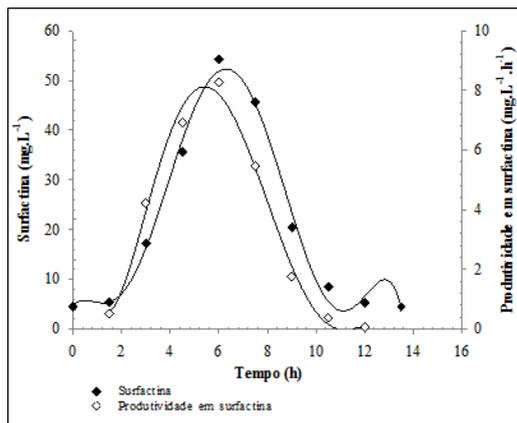


De acordo com a Figura 4.32, o fator de conversão de substrato em células encontrado no presente ensaio foi de  $0,17 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Ao contrário do que foi observado nos ensaios anteriores, nos quais houve duas fases de consumo de substrato, durante o presente cultivo verificou-se a ocorrência de somente uma fase de consumo de substrato. Esse comportamento pode ser estar relacionado ao maior coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio utilizado como referência, o qual permitiu que este cultivo fosse conduzido por mais tempo em condições suficientes de  $\text{O}_2$ .

Utilizando os dados de concentração de surfactina foi possível calcular as produtividades em surfactina para cada tempo, utilizando a Equação 3.12, conforme descrito no item 3.8.1.2.

Na Figura 4.33 estão apresentados os dados de concentração de surfactina e de produtividade em surfactina em função do tempo de cultivo

Figura 4.33 Evolução da produção de surfactina e da produtividade em surfactina durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,2 vvm 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo software *Microsoft Excel* 2013.

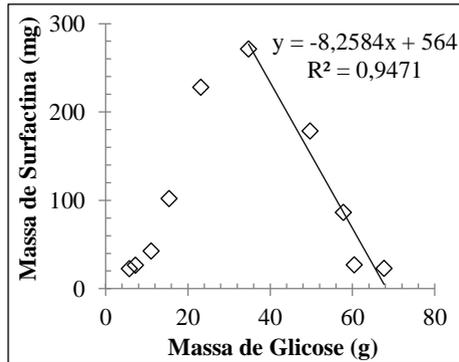


Observando a Figura 4.33, nota-se que a máxima produtividade em surfactina encontrada neste ensaio foi de  $8,28 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 6 h de cultivo. Esse resultado foi superior ao de  $5,72 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrado no cultivo operado em 0,2 vvm e 200 rpm, e é reflexo da maior frequência de agitação empregada, a qual contribuiu para a obtenção de maiores concentrações de surfactina em um menor tempo.

Além disso, é possível notar na Figura 4.33 que as curvas de produtividade em surfactina e de concentração de surfactina apresentaram perfis semelhantes e, por isso, a região de altas produtividades coincidiu com a região de altas concentrações de surfactina. Ao contrário do que ocorreu no ensaio realizado em 0,2 vvm e 200 rpm, a concentração de surfactina caiu bruscamente após ter alcançado seu máximo valor.

Na Figura 4.34 estão apresentados os dados de massa de surfactina em função da massa de substrato. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.34 Relação entre a produção de surfactina e a massa de substrato para determinação do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) durante o cultivo realizado em aeração superficial.



De acordo com a Figura 4.34, houve apenas uma fase de consumo de substrato para produção de surfactina. Essa fase, relativa às primeiras horas de cultivo, na qual houve maior disponibilidade de oxigênio, apresentou um  $Y_{P/S}$  de  $8,26 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ . Esse resultado foi semelhante ao de  $9,24 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  observado no mesmo intervalo de tempo no ensaio realizado sob  $0,2 \text{ vvm}$  e  $200 \text{ rpm}$ . Entretanto, posteriormente no presente ensaio observou-se uma enorme queda na massa de surfactina, e por isso, não houve uma segunda fase de consumo de substrato para a produção de surfactina.

#### 4.4.3.4 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator operado sob $k_L a$ de $39,2 \text{ h}^{-1}$ ( $0,3 \text{ vvm}$ ; $250 \text{ rpm}$ )

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para a quarta condição estudada, a qual teve como referência um  $k_L a$  de  $39,2 \text{ h}^{-1}$ , determinado a partir das condições de  $0,3 \text{ vvm}$  de aeração e  $250 \text{ rpm}$  de agitação.

Conforme descrito anteriormente, as massas de célula, glicose e surfactina foram determinadas tanto no volume de líquido efluente como no volume de líquido remanescente no reator em cada tempo. E a partir da soma dessas massas foi possível obter as quantidades totais de células, substrato e surfactina.

Na Tabela 4.17 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo

presente no biorreator, assim como dados da biomassa calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm

Tabela 4.17 Dados da biomassa em concentração (X) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Tempo (h)	X no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	X na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$X_m$ no reator (g)	$X_m$ na espuma (g)	$X_m$ total (g)
0	0,17		5000	0,85		0,85
1,5	0,28		5000	1,40		1,40
3,0	0,73	0,12	4820	3,52	0,02	3,54
4,5	1,03	0,30	4550	4,69	0,08	4,77
6,0	1,55	0,40	4010	6,21	0,22	6,43
7,5	1,90	0,45	3650	6,93	0,16	7,09
9,0	2,15	0,40	3380	7,27	0,11	7,38
10,5	2,38	0,35	3200	7,62	0,06	7,68
12,0	2,60		3200	8,32		8,32
13,5	2,37		3200	7,58		7,58

A partir dos dados da Tabela 4.17, verifica-se que em todas as coletas efetuadas a concentração celular no líquido efluente foi inferior à encontrada dentro do biorreator no mesmo instante. A quantidade máxima de células produzidas foi de 8,32 g em um volume de reação de 5 L, resultando em uma concentração celular máxima de  $1,66 \text{ g.L}^{-1}$ , após 12 horas de cultivo. Esse resultado foi inferior ao de  $2,42 \text{ g.L}^{-1}$  encontrado no ensaio conduzido nas condições de 0,2 vvm e 400 rpm, o que ocorreu em virtude do menor  $k_L a$  utilizado no presente estudo, o que significa que a transferência de oxigênio neste caso foi menos eficiente do que àquela verificada no cultivo realizado em 0,2 vvm e 400 rpm.

Davis, Lynch e Varley (1999) cultivaram *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina em meio composto por  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, utilizando uma vazão de aeração de 0,5 vvm e uma frequência de agitação de 300 rpm. A máxima concentração celular obtida foi de  $5,95 \text{ g.L}^{-1}$ , a qual foi muito superior à encontrada no presente ensaio, o que pode ser explicado pela maior concentração inicial de substrato utilizada por esses autores.

De acordo com os dados da Tabela 4.17, o volume total de espuma removido foi de 1800 mL, e foi maior do que o volume (1250 ml) recolhido durante o ensaio realizado com 0,2 vvm e 400 rpm. Dessa forma, nota-se que embora o presente cultivo tenha sido realizado sob  $k_{LA}$  inferior àquele referente as condições de 0,2 vvm e 400 rpm, o volume de espuma produzido foi maior neste caso. Isso sugere que o aumento da vazão de aeração contribui de maneira significativa para a formação de um maior volume de espuma.

Na Tabela 4.18 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, bem como dados da glicose calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Tabela 4.18 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	S na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$S_m$ no reator (g)	$S_m$ na espuma (g)	$S_m$ total (g)
0	12,05		5000	60,25		60,25
1,5	10,98		5000	54,90		54,90
3,0	10,43	8,92	4820	50,27	1,60	51,87
4,5	9,51	7,71	4550	43,27	2,08	45,35
6,0	6,51	5,04	4010	26,10	2,72	28,82
7,5	5,77	5,17	3650	21,06	1,86	22,92
9,0	4,03	3,96	3380	13,62	1,07	14,69
10,5	2,81	2,57	3200	8,99	0,46	9,45
12,0	0,86		3200	2,75		2,75
13,5	0,38		3200	1,22		1,22

De acordo com os dados da Tabela 4.18, nota-se que em todas as coletas efetuadas a concentração de glicose no líquido efluente em cada tempo foi inferior semelhante observada no biorreator.

Na Tabela 4.19 estão apresentados os dados da surfactina em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm.

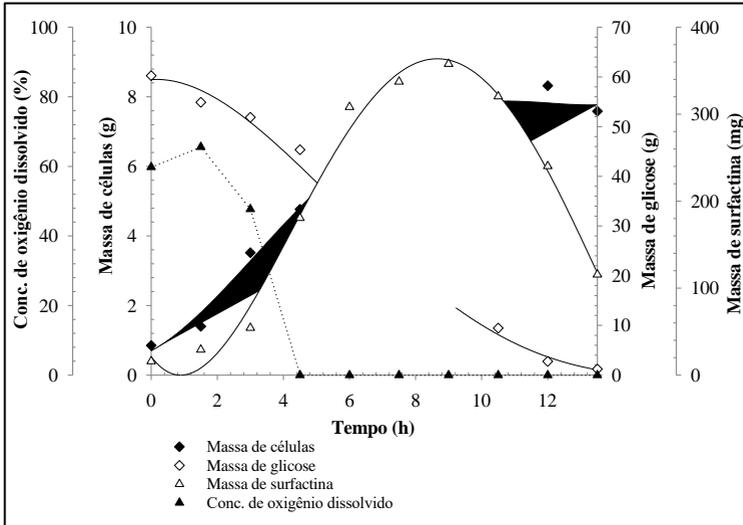
Tabela 4.19 Dados da surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Tempo (h)	P no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	P na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$P_m$ no reator (g)	$P_m$ na espuma (g)	$P_m$ total (g)
0	3,2		5000	15,8		15,8
1,5	5,8		5000	29,2		29,2
3,0	6,2	133,2	4820	30,3	24,0	54,3
4,5	28,2	193,7	4550	128,4	52,3	180,7
6,0	44,8	238,2	4010	179,6	128,6	308,2
7,5	58,4	344,6	3650	213,3	124,0	337,3
9,0	73,7	402,0	3380	249,2	108,5	357,7
10,5	75,2	443,1	3200	240,7	79,7	320,4
12,0	75,1		3200	240,3		240,3
13,5	36,1		3200	115,5		115,5

Observando a Tabela 4.19, verifica-se que em todas as coletas realizadas a concentração de surfactina no líquido efluente foi superior àquela encontrada no biorreator no mesmo instante, sendo  $443,1 \text{ mg.L}^{-1}$  a máxima concentração de surfactina obtida na espuma, enquanto no reator nesse mesmo tempo a concentração era de  $75,2 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Na Figura 4.35 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Figura 4.35 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo *software Microsoft Excel* 2013.



Observando a Figura 4.35, nota-se que após 4,5 h de cultivo, a concentração de oxigênio dissolvido caiu para 0%, o que significa que a partir das 4,5 o processo passou a ser conduzido em condições limitadas de oxigênio. Contudo, ainda foi possível verificar um aumento da concentração celular até as 12 h de cultivo, indicando que *Bacillus subtilis* ATCC 21332 foi capaz de crescer mesmo com pouca disponibilidade de  $O_2$ .

A partir da Tabela 4.19 e da Figura 4.35, observa-se que a quantidade máxima de surfactina produzida foi de 357,7 mg em um volume de reação de 5 L, o que equivale a um concentração máxima de  $71,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 9 h de cultivo. Apesar de o presente cultivo ter sido conduzido sob um  $k_L a$  menor, a concentração máxima de surfactina obtida foi superior à encontrada no cultivo realizado nas condições de 0,2 vvm e 400 rpm.

Amani et al. (2010) avaliou a produção de biosurfactante através do cultivo de *Bacillus subtilis* em meio composto por  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, sob condições de 1,5 vvm de aeração e 300 rpm de agitação, as quais determinam um  $k_L a$  de  $42,1 \text{ h}^{-1}$ . A máxima concentração de

surfactina obtida foi de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , após 44 h de cultivo, e esse resultado foi superior ao encontrado no presente trabalho. Esses autores utilizaram um coletor de espuma para a recuperação do biossurfactante e a concentração de oxigênio dissolvido aumentou linearmente com o tempo, sendo que até as 44 h de cultivo essa concentração tinha alcançado um valor próximo a 35%.

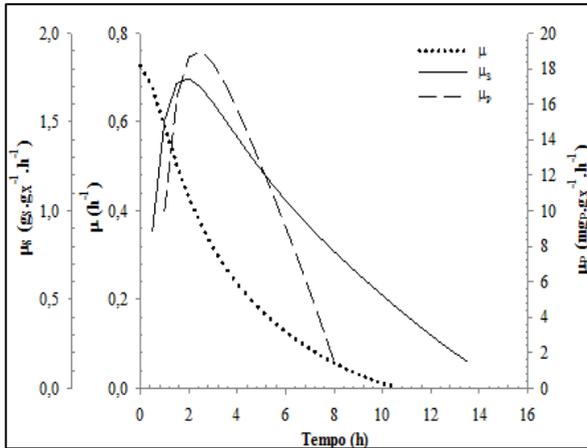
Apesar da concentração celular máxima encontrada no presente ensaio ter sido inferior àquela obtida no cultivo conduzido em 0,2 vvm e 400 rpm, a máxima concentração de surfactina alcançada foi maior. Entretanto, no cultivo anterior houve uma queda acentuada na concentração de surfactina após 6 h, e no presente ensaio essa queda foi menor e ocorreu somente após 10,5 h de cultivo. Dessa forma, nota-se que ocorreu alguma limitação durante o ensaio realizado sob 0,2 vvm e 400 rpm que impediu a obtenção de maiores concentrações de surfactina, já que o  $k_{L,a}$  utilizado era maior do que o empregado no presente cultivo.

É importante considerar que os  $k_{L,a}$ s utilizados como referência para a realização dos ensaios apresentados neste trabalho foram determinados em água destilada e sem a presença de microrganismos. No entanto, segundo Schmidell (2001), durante um processo fermentativo, a atividade microbiana pode provocar alterações nas características do meio, criando resistências adicionais à transferência de oxigênio, e, interferindo, dessa forma, no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Yeh, Wei e Chang (2006) avaliaram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio composto por  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, sob as condições de 0,5 vvm e 250 rpm. Os resultados mostraram que a concentração máxima de surfactina produzida foi de  $2233 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 38 h de cultivo. Essa concentração foi muito superior à obtida no presente cultivo, o que pode ter ocorrido em função da maior vazão específica de aeração utilizada, a qual pode ter promovido uma transferência de oxigênio mais eficiente, pela maior concentração inicial de substrato e também pelo emprego de um sistema para reciclo do meio de cultivo que foi removido do reator junto com a espuma formada, evitando assim a perda de biomassa e de nutrientes durante o processo. Além disso, é necessário observar que esses autores determinaram a surfactina somente na espuma coletada, sem considerar o volume de reação, enquanto que no presente cultivo a surfactina presente no biorreator foi somada àquela encontrada na espuma, considerando o volume de espuma produzido em cada intervalo de tempo.

Na Figura 4.36 estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de glicose e de produção de surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.36 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm.

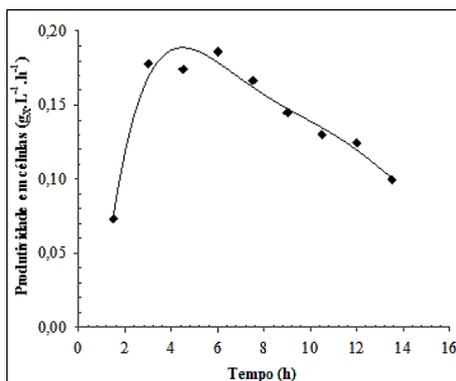


A partir da Figura 4.36, verifica-se que até as 4,5 h de cultivo as curvas das velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e de produção ( $\mu_P$ ) exibiram perfis semelhantes, indicando que durante as primeiras horas de cultivo a produção de surfactina esteve associada ao consumo de substrato. Após esse período, foi possível observar que a velocidade específica de consumo de substrato caiu quase que linearmente com o tempo, enquanto a velocidade específica de produção caiu drasticamente até as 8 h de cultivo.

A partir dos dados de concentração celular foi possível calcular as produtividades em células para cada tempo, utilizando a Equação 3.11, segundo o item 3.8.1.2.

Na Figura 4.37 encontra-se a evolução da produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

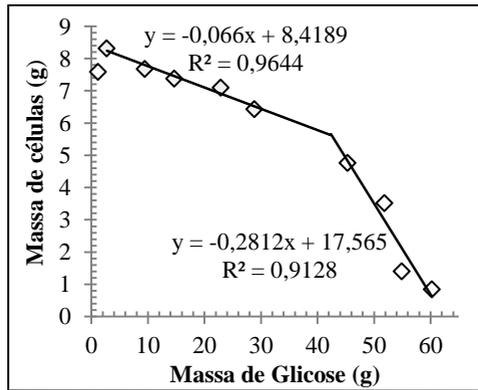
Figura 4.37 Evolução da produtividade em células ao longo do cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm.



De acordo com a Figura 4.37, a máxima produtividade em células obtida foi de  $0,186 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Esse resultado foi inferior ao de  $0,226 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrado no ensaio realizado sob as condições de 0,2 vvm e 400 rpm. Essa menor produtividade pode estar relacionada ao menor coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio utilizado no presente estudo, o que ocasionou um menor crescimento celular. Além disso, a máxima concentração celular foi encontrada após 12 h, ou seja, a concentração celular continuou aumentando mesmo após a máxima produtividade em células ter sido alcançada.

Na Figura 4.38 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.38 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.

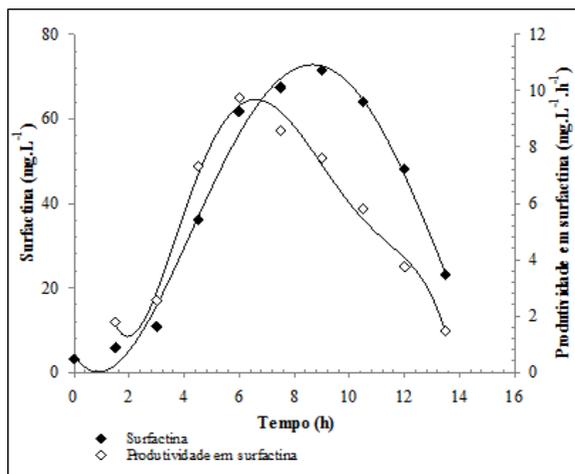


Através da análise da Figura 4.39, foi possível observar a ocorrência de duas fases distintas de consumo de substrato. A primeira fase, correspondente ao segundo trecho do gráfico, ocorreu durante a fase exponencial de crescimento e apresentou um fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,28 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Já a segunda fase de consumo de substrato, representada pelo primeiro trecho no gráfico, apresentou um  $Y_{X/S}$  de  $0,07 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . O maior valor de  $Y_{X/S}$  na primeira fase pode ser justificado pela maior disponibilidade de  $\text{O}_2$  durante a fase exponencial de crescimento. Após esse período, o microrganismo passou a ser cultivado sob condição de limitação de  $\text{O}_2$ , o que produziu um menor fator de conversão de substrato em células.

Com as concentrações de surfactina calculadas em cada tempo foi possível calcular as produtividades em surfactina utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.39 estão apresentados os dados de concentração de surfactina e de produtividade em surfactina em função do tempo de cultivo.

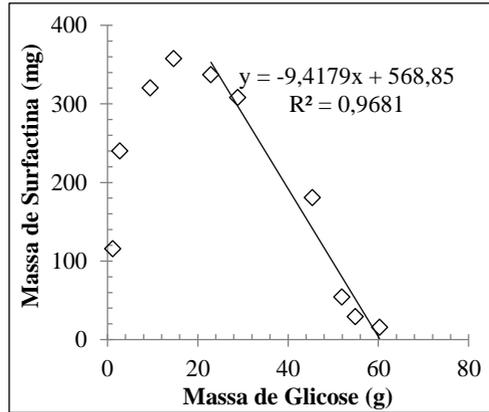
Figura 4.39 Evolução da produção de surfactina e da produtividade durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 250 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo *software Microsoft Excel* 2013.



Observando a Figura 4.39, nota-se que a máxima produtividade em surfactina encontrada neste ensaio foi de  $9,75 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 6 h de cultivo, enquanto a máxima concentração de surfactina foi obtida no instante 9 h. Nesse caso a região de altas concentrações de surfactina encontra-se ligeiramente deslocada da região de altas produtividades, pois a concentração de surfactina continuou aumentando até 9 h, apesar da máxima produtividade já ter sido alcançada em 6 h.

Na Figura 4.40 estão apresentados os dados da produção de surfactina em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.40 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.



De acordo com a Figura 4.40, houve apenas uma fase de consumo de substrato para produção de surfactina. Essa fase, correspondente às primeiras horas de cultivo, na qual houve maior disponibilidade de oxigênio, apresentou um  $Y_{P/S}$  de  $9,42 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ .

#### 4.4.3.5 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator operado sob $k_L a$ de $70,3 \text{ h}^{-1}$ ( $0,3 \text{ vvm}$ e $400 \text{ rpm}$ )

A seguir serão apresentados os resultados para a última condição estudada, a qual teve como referência um  $k_L a$  de  $70,3 \text{ h}^{-1}$ , obtido a partir de uma vazão específica de aeração de  $0,3 \text{ vvm}$  e uma frequência de agitação de  $400 \text{ rpm}$ .

Dentre os cultivos realizados, este foi o que apresentou formação de maior volume de espuma, o que ocorreu em função do maior coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Conforme descrito anteriormente, as massas de X, S e P foram determinadas tanto no volume de líquido efluente como no volume de líquido remanescente no reator em cada tempo. A partir da soma dessas massas foi possível obter as quantidades totais de células, substrato e surfactina.

Na Tabela 4.20 estão apresentados os dados da biomassa em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da biomassa calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Tabela 4.20 Dados da biomassa em concentração ( $X$ ) e em massa ( $X_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Tempo (h)	X no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	X na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$X_m$ no reator (g)	$X_m$ na espuma (g)	$X_m$ total (g)
0	0,15		5000	0,75		0,75
1,5	0,25		5000	1,25		1,25
3,0	0,40		5000	2,00		2,00
4,5	0,93	0,17	4700	4,37	0,05	4,42
6,0	1,85	0,55	4300	7,96	0,22	8,18
7,5	2,50	0,72	3800	9,50	0,36	9,86
9,0	4,12	0,87	3200	13,18	0,52	13,70
10,5	4,70	0,88	3000	14,10	0,18	14,28

Observando os dados da Tabela 4.20, nota-se que em todas as coletas realizadas a concentração celular no líquido efluente foi inferior à encontrada dentro do biorreator no mesmo instante. A quantidade máxima de células produzidas foi de 14,28 g em um volume de reação de 5 L, resultando em uma concentração celular máxima de  $2,85 \text{ g.L}^{-1}$ , após 10,5 horas de cultivo. Esse resultado foi superior ao de  $2,42 \text{ g.L}^{-1}$  obtido no ensaio conduzido nas condições de 0,2 vvm e 400 rpm, o que pode ser explicado pelo maior  $k_{L,a}$  utilizado no presente estudo.

Cooper et al. (1981) cultivaram *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina em meio composto por  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, sob 0,9 vvm e 200 rpm, e encontraram uma concentração celular máxima de  $4,6 \text{ g.L}^{-1}$ . Essa maior concentração celular obtida por esses autores está relacionada à maior concentração inicial de glicose utilizada.

Ainda de acordo com os dados da Tabela 4.20, o volume total de espuma produzido foi de 2000 mL, e este volume foi maior do que o produzido durante o cultivo realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm, o que ocorreu em virtude da maior frequência de agitação empregada.

Na Tabela 4.21 estão apresentados os dados da glicose em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, bem como os dados da glicose calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Tabela 4.21 Dados da glicose em concentração (S) e em massa ( $S_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Tempo (h)	S no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	S na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$S_m$ no reator (g)	$S_m$ na espuma (g)	$S_m$ total (g)
0	13,09		5000	65,45		65,45
1,5	12,78		5000	63,90		63,90
3,0	11,76		5000	58,80		58,80
4,5	8,62	8,36	4700	40,51	2,51	43,02
6,0	6,45	5,20	4300	27,73	2,08	29,81
7,5	4,75	4,66	3800	18,05	2,33	20,38
9,0	1,05	1,83	3200	3,36	1,10	4,46
10,5	0,16	0,23	3000	0,48	0,05	0,53

Observando os dados da Tabela 4.21, nota-se que nos instantes 4,5 h, 6,0 h e 7,5 h, a concentração de glicose no líquido efluente foi semelhante àquela observada no biorreator. Já nos instantes 9,0 h e 10,5 h, a concentração de glicose na espuma foi superior à encontrada no reator.

Na Tabela 4.22 estão apresentados os dados da surfactina em concentração, encontrados no líquido efluente e no caldo de cultivo presente no biorreator, assim como os dados da surfactina calculados em massa, para o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 400 rpm.

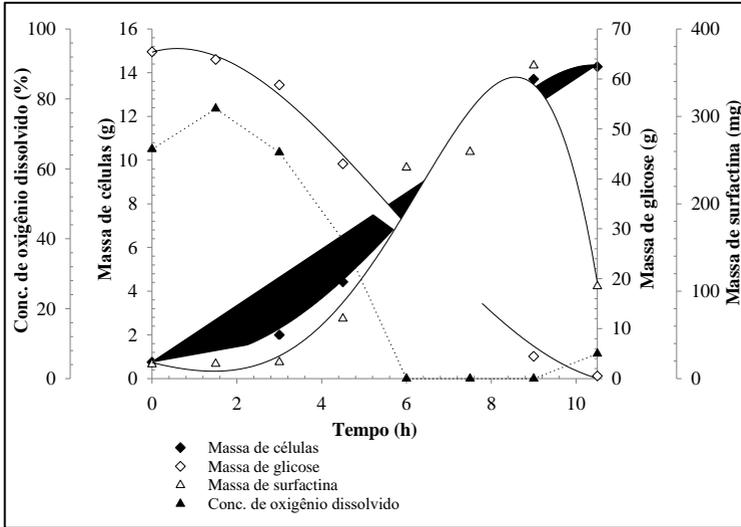
Tabela 4.22 Dados da produção de surfactina em concentração (P) e em massa ( $P_m$ ) para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Tempo (h)	P no reator ( $\text{g.L}^{-1}$ )	P na espuma ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Volume no reator (mL)	$P_m$ no reator (g)	$P_m$ na espuma (g)	$P_m$ total (g)
0	3,3		5000	16,3		16,3
1,5	3,4		5000	16,9		16,9
3,0	3,7	133,2	5000	18,7		18,7
4,5	6,6	124,4	4700	31,2	37,3	68,5
6,0	430	141,8	4300	184,8	56,7	241,5
7,5	45,0	176,4	3800	171,2	88,2	259,4
9,0	63,7	257,6	3200	203,8	154,5	358,3
10,5	19,3	237,9	3000	58,0	47,6	105,6

A partir dos dados da Tabela 4.22, observa-se que em todas as coletas efetuadas a concentração de surfactina no líquido efluente foi superior à encontrada no biorreator no mesmo instante. Além disso, as concentrações de surfactina encontradas na espuma durante o presente cultivo foram menores do que as obtidas a partir da espuma coletada durante o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm.

Na Figura 4.41 estão apresentados os dados de crescimento celular, consumo do substrato, produção de surfactina e concentração de oxigênio dissolvido para o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 400 rpm.

Figura 4.41 Evolução do crescimento celular, consumo da glicose, produção de surfactina e da concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo *software Microsoft Excel* 2013.

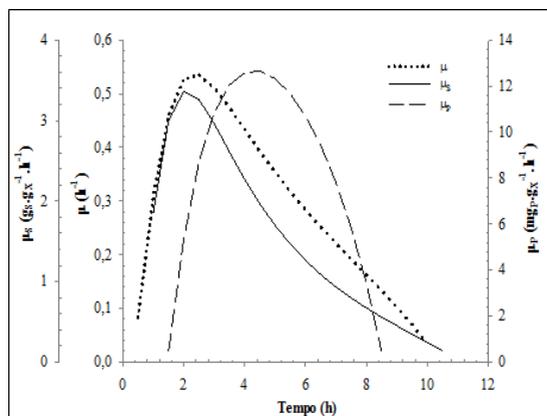


A partir da Figura 4.41, nota-se que após 6 h de cultivo a concentração de oxigênio dissolvido caiu para 0%, e a partir de então, o processo passou a ser conduzido em condições limitadas de oxigênio. Comparando este comportamento com o observado nos ensaios anteriores, verifica-se que neste caso o cultivo permaneceu em condições suficientes de oxigênio por mais tempo, o que pode ser justificado pelo maior coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio utilizado.

De acordo com a Tabela 4.22 e Figura 4.41, a quantidade máxima de surfactina produzida foi de 358,3 mg em um volume de reação de 5 L, o que equivale a uma concentração máxima de  $71,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , após 9 h de cultivo. Esse resultado foi muito próximo ao obtido durante o ensaio realizado sob 0,3 vvm e 250 rpm, embora o presente cultivo tenha sido operado em uma frequência de agitação maior e, conseqüentemente, sob um  $k_L a$  maior.

Na Figura 4.42 estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicose e de produção de surfactina ao longo do tempo de cultivo.

Figura 4.42 Representação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332, de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) e de produção de surfactina ( $\mu_P$ ) em biorreator conduzido sob 0,3 vvm e 400 rpm.

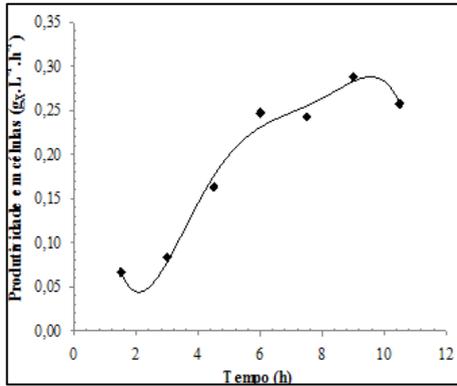


A partir da Figura 4.42, verifica-se que as curvas das velocidades específicas de consumo de substrato e de crescimento apresentaram uma boa correlação. Apesar da curva de velocidade específica de produção estar um pouco deslocada, seu perfil foi ligeiramente próximo ao perfil da curva de velocidade específica de crescimento, sugerindo que a produção de surfactina foi associada ao crescimento.

Através dos dados de concentração celular foi possível calcular a produtividade em células, utilizando a Equação 3.11, conforme descrito no item 3.8.1.2.

Na Figura 4.43 encontra-se a evolução da produtividade em células ao longo do tempo de cultivo.

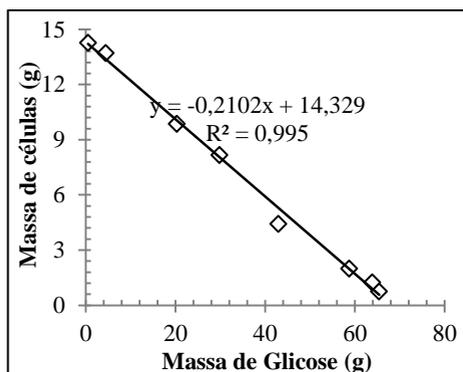
Figura 4.43 Evolução da produtividade em células durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 400 rpm.



De acordo com a Figura 4.43, a máxima produtividade em células encontrada foi de  $0,288 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 9 h de cultivo, enquanto a máxima concentração celular foi encontrada no instante 10,5 h. Essa máxima produtividade em células foi superior à obtida durante o cultivo conduzido sob 0,3 vvm e 250 rpm, o que está relacionado à maior disponibilidade de oxigênio promovida pelas condições de aeração e agitação empregadas ( $k_L a = 70,3 \text{ h}^{-1}$ ).

Na Figura 4.44 estão apresentados os dados do crescimento celular em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.44 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.

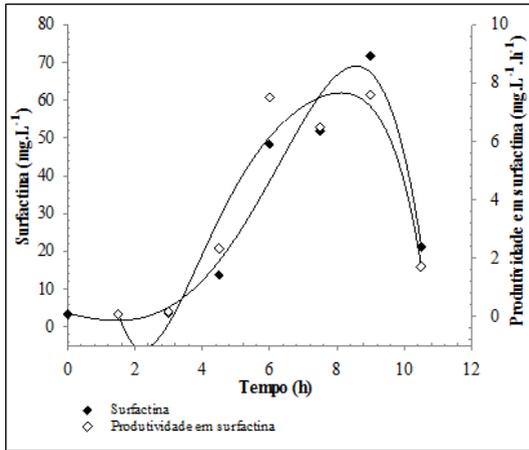


Conforme pode ser observado na Figura 4.44, o fator de conversão de substrato em células encontrado no presente ensaio foi de  $0,21 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Ao contrário do que foi observado nos ensaios anteriores, nos quais foi possível identificar duas fases de consumo de substrato, durante o presente cultivo verificou-se a ocorrência de somente uma fase de consumo de substrato. Esse comportamento pode ser justificado pelo maior coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio utilizado como referência, o qual permitiu que este cultivo fosse conduzido por mais tempo em condições suficientes de  $\text{O}_2$ .

Através das concentrações de surfactina calculadas em cada tempo foi possível calcular as produtividades em surfactina utilizando a Equação 3.12.

Na Figura 4.45 estão apresentados os dados de concentração de surfactina e de produtividade em surfactina em função do tempo de cultivo.

Figura 4.45 Evolução da produção de surfactina e da produtividade durante o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator conduzido sob 0,3 vvm 400 rpm. A linha contínua representa os ajustes polinomiais feitos pelo *software Microsoft Excel* 2013.



Analisando a Figura 4.45, verifica-se que a máxima produtividade em surfactina encontrada neste ensaio foi de  $7,60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 9 h de cultivo. Essa produtividade foi menor do que a de  $9,75 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , encontrada durante o cultivo conduzido nas condições de 0,3 vvm e 250 rpm.

Segundo os resultados apresentados no item 4.2, o aumento da frequência de agitação favorece o aumento do coeficiente volumétrico de transferência de ( $k_L a$ ), promovendo uma melhor transferência de oxigênio e contribuindo, assim, para a obtenção de elevadas produtividades. Contudo, no presente estudo, observou-se que o aumento da frequência de agitação de 250 rpm para 400 rpm, não proporcionou um aumento da produtividade.

Yeh, Wei e Chang (2006) estudaram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando diferentes coeficientes de transferência de oxigênio. Esses autores encontraram que existe uma tendência da produtividade de surfactina aumentar com o aumento dos valores de  $k_L a$ , exceto para os ensaios em que houve intensa formação de espuma, nos quais obteve-se menores produtividades, embora houvesse maior disponibilidade de oxigênio.

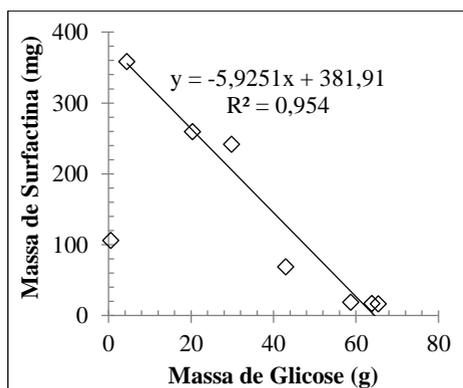
Davis, Lynch e Varley (2001) avaliaram a influência da frequência de agitação na produção de surfactina e observaram que,

quando os cultivos foram realizados em altas frequências de agitação, houve formação excessiva de espuma, o que ocasionou uma perda significativa do volume do caldo de cultivo em um curto período de tempo, resultando em baixas produções de surfactina.

Segundo Davis, Lynch e Varley (2001), a biossíntese da surfactina requer um número de peptídeos sinalizadores extracelulares. Alguns desses peptídeos podem ser removidos com a espuma durante o processo, ocasionando, assim, a diminuição da biossíntese da surfactina.

Na Figura 4.46 estão apresentados os dados da produção de surfactina em função da massa do substrato. O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) foi determinado a partir do coeficiente angular do trecho linear da curva.

Figura 4.46 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{P/S}$ ) de *B. subtilis* ATCC 21332.



Segundo a Figura 4.46, o valor do  $Y_{P/S}$  encontrado foi de  $5,92 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ . Esse resultado foi menor do que os de  $9,42 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  e  $8,26 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ , encontrados durante os ensaios conduzidos sob  $0,3 \text{ vvm}$  e  $250 \text{ rpm}$  e  $0,2 \text{ vvm}$  e  $400 \text{ rpm}$ , respectivamente. Na verdade, no presente ensaio houve a maior saída de líquido do biorreator, além do fato da concentração de glicose no líquido efluente ter sido muito semelhante à encontrada dentro no reator. Esses fatores em conjunto acarretaram em uma perda considerável de glicose, o que proporcionou um menor fator de conversão do substrato em produto.

#### 4.5 Avaliação da influência da transferência de oxigênio na produção de surfactina

Na Tabela 4.23 encontram-se as máximas concentrações de surfactina e as produtividades globais em surfactina, obtidas durante os cultivos realizados em biorreator, com seus respectivos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio.

Tabela 4.23 Máximas concentrações de surfactina e máximas produtividades encontradas durante os cultivos conduzidos em biorreator.

$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )	Condição	Máxima concentração de surfactina ( $mg.L^{-1}$ )	Produtividade máxima em surfactina ( $mg.L^{-1}.h^{-1}$ )
-	Anaerobiose	67,6	5,85
2,4	1,0 vvm e 500 rpm*	68,3	4,71
8,5	0,2 vvm e 100 rpm	42,4	5,88
13,3	0,2 vvm e 200 rpm	47,7	5,72
51,2	0,2 vvm e 400 rpm	54,3	8,28
39,2	0,3 vvm e 250 rpm	71,6	9,75
70,3	0,3 vvm e 400 rpm	71,7	7,60

\*Aeração superficial

Observando a Tabela 4.23, nota-se que, em relação às máximas concentrações de surfactina não se pode afirmar que a utilização de aeração proporcionou um avanço muito grande, pois os ensaios realizados utilizando os maiores valores de  $k_{La}$ , dentre os empregados neste trabalho, alcançaram concentrações de surfactina muito próximas ao ensaio conduzido em anaerobiose. No entanto, para as produtividades máximas em surfactina foi possível observar um certo avanço em comparação com o ensaio realizado em anaerobiose, em particular para os três últimos cultivos.

Para os ensaios realizados com aeração em profundidade, observou-se que a concentração de surfactina foi muito maior no líquido efluente do que dentro do biorreator. Logo, a maior parte do biosurfactante produzido foi recuperada através da espuma, e, assim, o emprego de aeração apresenta-se viável no sentido que permite a obtenção de altas concentrações do produto na espuma removida do

biorreator. Além disso, foi possível observar que na maioria dos casos houve uma redução da concentração celular, assim como da concentração de substrato, na espuma, em relação ao que foi encontrado no reator, o que pode ser de grande importância, dependendo de como se pretende operar o biorreator.



## 5 CONCLUSÕES

Através da realização do estudo cinético em biorreator foi possível entender como a eficiência da transferência de oxigênio, representada pelo  $k_{La}$ , influencia o desempenho do processo de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio mineral salino, utilizando  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose.

A condução do processo fermentativo sob determinados valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio favoreceu a formação de espuma, a partir da qual foi possível recuperar grande parte biossurfactante praticamente livre de células.

Os cultivos realizados em anaerobiose e em aeração superficial alcançaram altas concentrações de surfactina, quando comparados aos ensaios conduzidos com aeração em profundidade. Entretanto, a utilização de altos valores de  $k_{La}$  proporcionou maiores produtividades em surfactina, além de elevadas concentrações de surfactina no líquido efluente, indicando que a operação do biorreator com aeração em profundidade apresenta-se mais conveniente para a produção de surfactina em relação ao processo em anaerobiose, desde que o produto seja recuperado na espuma.

Observou-se ainda que o estudo cinético forneceu informações potencialmente úteis em relação a forma mais adequada de operação do biorreator, e pode servir como base para o projeto de um processo contínuo.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influência da concentração de surfactina no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ).
- Verificar a ocorrência de correlação entre a  $k_{La}$  com a potência transferida ao líquido ( $P_g/V$ ) e a velocidade superficial do ar em distintas concentrações de surfactina.
- Realizar cultivos em biorreator operado em modo contínuo, de forma a recuperar a surfactina presente na espuma e obter maiores produtividades em surfactina.



## 7 REFERÊNCIAS

AIBA, S; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N.F. **Biochemical Engineering**. Tóquio: University of Tokio Press, 2 ed., 1973. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001.

AMANI, H.; MEHRNIA, M. R.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; SOUDI, M. R. Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 510–523, 2010.

BADINO, A. C. J.; ALMEIDA, P. I. F.; CRUZ, A. J. G. Agitation and Aeration: an Automated Didactic Experiment. **Chemical Engineering Education**, v. 38, n. 2, p. 100–1007, 2004.

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 841–853, 2009.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. De; MARÓSTICA, M. R. J.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.

CHEN, C.-Y.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1923–1931, 2006.

CHEN, W.-C.; JUANG, R.-S.; WEI, Y.-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous

product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408–412, 1981.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2008. UNICAMP, 2008.

DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. Ed. Edgard Bluncher, 2011. p. 35-37.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322–329, 1999.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 346–354, 2001.

DEBON, J. **Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia**. 2015. 168p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação de Engenharia Química, UFSC, Florianópolis.

DESAI, D. J.; BANAI, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P.; GANCEL, F.; DELAPLACE, G.; 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.

FERNANDES, P. L. **Produção de biosurfactantes por bacillus spp . em condição anaeróbia**. 2007. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of

Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

GUEZ, J. S.; MÜLLER, C. H.; DANZE, P. M.; BÜCHS, J.; JACQUES, P. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. **Journal of Biotechnology**, v. 134, n. 1-2, p. 121–126, 2008.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41–46, 1997.

KOCH, V.; RÜFFER, H.-M.; SCHÜGERL, K.; INNERTSBERGER, E.; MENZEL, H.; WEIS, J. Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 435–446, 1995.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas Aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas.** 2007. 153p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação de Engenharia Química, UFRJ, Rio de Janeiro.

LIN, S.-C. Biosurfactants: Recent advances. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 109–120, 1996.

LIN, S. C.; GOURSAUD, J. C.; KRAMER, P. J.; GEORGIU, G.; SHARMA, M. M. Production of Biosurfactant by *Bacillus Licheniformis* Strain JF-2. **Microbial Enhancement of Oil Recovery**, v. 31, p. 219–226, 1991.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

MANO, M. C. R. **Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.** 2008. 111p.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, UNICAMP, Campinas.

MOYA, I.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; JURADO, E.; GARCÍA, M.; BANAT, I. M. Bioresource Technology Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 231–236, 2015.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F.; JAMES, S.; BENNETT, H. J. P. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 21, p. 3812–3820, 1999.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

OLIVEIRA, D. W. F. De; FRANÇA, Í. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 2013.

ÖZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 729–741, 2001.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.

PERNA, R. F. **Fracionamento de surfactina em colunas de bolhas e espuma**. 2010. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

REIS, R. C. N. **Síntese de surfactantes derivados da d-ribonolactona**. 2007. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. v.1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 277–330.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. v.1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 277–330.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 119–134, 2010.

SILVA, M. T. S. da; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SANTANA, C. C. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 91–97, 2015.

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da produção de biosurfactante por isolado bacillus subtilis a partir de matéria prima renovável e de baixo custo**. 2008. 2008.

WESTERTERP, K. R.; VAN DIERENDONCK, L. L.; DE KRAA, J. A. Interfacial areas in agitated gas-liquid contactors. **Chemical Engineering Science**, v. 18, p. 157–168, 1963.

WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 1, p. 155–163, 2008.

WILLENBACHER, J.; RAU, J.; ROGALLA, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Foam-free production of Surfactin via anaerobic fermentation of *Bacillus subtilis* DSM 10 T. **AMB Express**, v. 5, n. 21, p. 1–9, 2015.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1706–1713, 1995.

YAKIMOV, M. M.; AMRO, M. M.; BOCK, M.; BOSEKER, K.; FREDRICKSON, H. L.; KESSEL, D. G.; TIMMIS, K. N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 18, n. 1–2, p. 147–160, 1997.

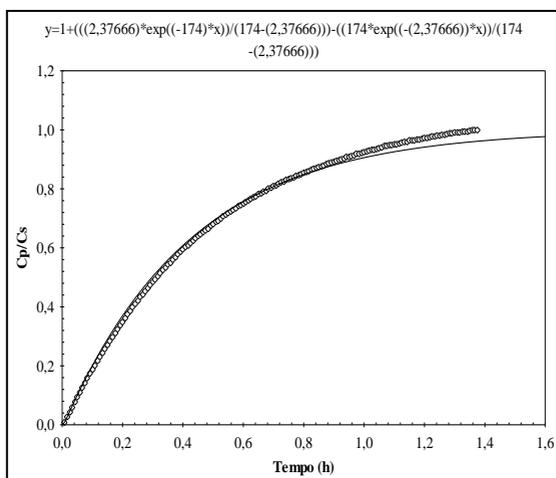
YEH, M.; WEI, Y.; CHANG, J. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1799–1805, 2006.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D. R.; DUNCAN, K. E.; MCINERNEY, M. J.; FOLMSBEE, M.; FINCHER, T.; KNAPP, R. M. In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1239–1247, 2007.

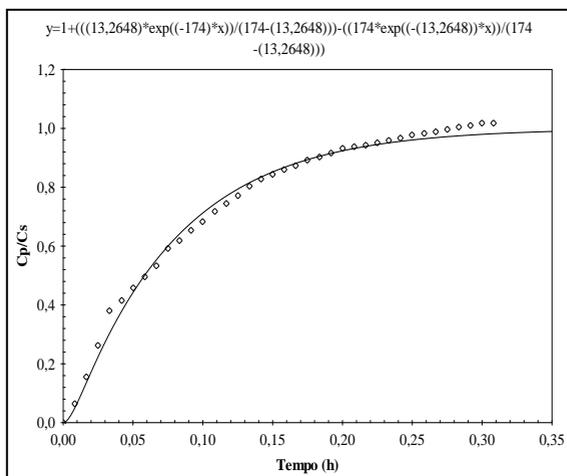
## 8 APÊNCICE

### Apêndice A - Dados experimentais para a determinação do $k_L a$

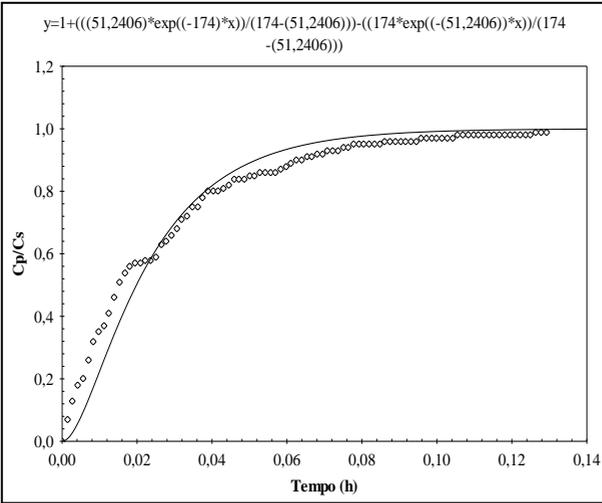
i) 1,0 vvm e 500 rpm (Aeração superficial)



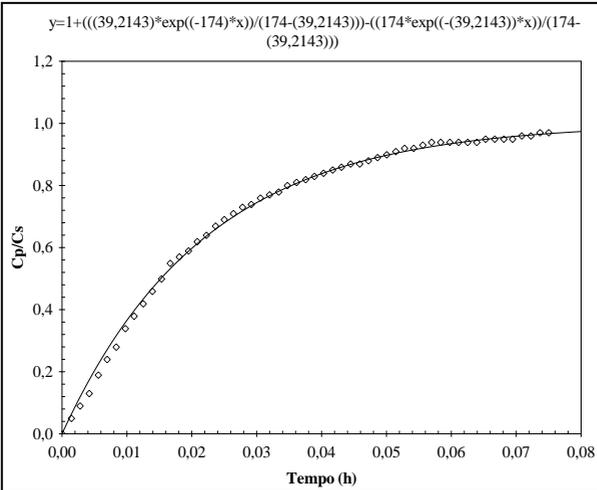
ii) 0,2 vvm e 200 rpm (Aeração em profundidade)



## iii) 0,2 vvm e 400 rpm (Aeração em profundidade)



## iv) 0,3 vvm e 250 rpm (Aeração em profundidade)



v) 0,3 vvm e 400 rpm (Aeração em profundidade)

