



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

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis*
ATCC 21332 EM CONDIÇÃO ANAERÓBIA**

**JANAINA DEBON
Engenheira de Alimentos
MSc. Engenharia de Alimentos**

**Florianópolis – SC
2015**

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

JANAINA DEBON

**PRODUÇÃO DE BLOSSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis*
ATCC 21332 EM CONDIÇÃO ANAERÓBIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química do Centro Tecnológico da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito final à obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
Coorientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

**Florianópolis – SC
2015**

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

Debon, Janaina

Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia. / Janaina Debon ; orientador, Hugo Moreira Soares ; coorientador, Willibaldo Schmidell Netto. - Florianópolis, SC, 2015.
165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela proteção em cada passo da minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Hugo Moreira Soares pela orientação e confiança.

Ao Professor Dr. Willibaldo Schmidell, meu co-orientador, que muito admiro. Obrigada pela paciência, confiança, disponibilidade e generosidade. Sou muito grata pela rica orientação e pelas correções e críticas, sempre muito bem vindas para meu crescimento profissional.

A todos os colegas do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos – LTBR, em especial ao Lorenzo, Fábio e à Natália, que me acompanharam na parte experimental e não mediram esforços para que tudo pudesse ser cumprido. Agradeço a todos pela amizade, experiências compartilhadas e pelos bons momentos que passamos juntos.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

À PETROBRAS, pelo apoio financeiro ao projeto.

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

À Prof^ª. Dra. Gláucia M.F. de Aragão por ceder a infraestrutura do ENGEBIO para realização de parte experimental desta Tese.

Ao LCP da Universidade Federal de Santa Catarina, pelas análises de FTIR.

Às minhas amigas Naiana, Kelin, Camila, Diane, Gabriela e Daniela pelo apoio, palavras de incentivo, pelas longas conversas, altas risadas, pela amizade e por emprestarem o ouvido para os longos desabafos.

A amiga e colega de apartamento Kellen, que me acompanhou durante boa parte do doutorado, mesmo que a distância. Obrigada pelo carinho, pela amizade, pelos bons momentos compartilhados, pelo tempo dedicado e toda a ajuda despendida para a finalização desta Tese.

À minha amiga Kátia, por estar presente em todos os momentos e pelos longos anos de amizade. De coração, obrigada pela nossa linda e sincera amizade!

E em especial a minha família. Aos meus pais, Jacira e Florindo (*in memoriam*), por todos os ensinamentos, pela força, pelo amor e pelo

exemplo de vida. Minha querida irmã e meu cunhado, pela coragem, pelo incentivo e apoio, amizade e acima de tudo por acreditarem em mim. Meus sobrinhos, Victória e João Victor, pelas palavras doces, brincadeiras engraçadas, pelos sorrisos e pelo amor mais sincero. Dedico este trabalho a vocês!

A todos aqueles que realmente torceram e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

*“Não te deixes vencer
Pela hora vazia.
Cérebro sem trabalho
É reduto de sombra.
Casa desocupada
Guarda animais daninhos.
Tempo que te pertença
Podes dá-lo em serviço.
Qualquer auxílio a outrem
É socorro a ti mesmo.
Não desprezes o tempo,
Que o tempo vem de Deus.”*

Francisco Candido Xavier

RESUMO

Biossurfactantes são compostos anfífilos de origem biológica que possuem capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Dentre os mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina. Devido aos seus altos custos de produção sua aplicação ainda é limitada, tornando-se necessário processos que viabilizam economicamente sua produção. A produção de surfactina a partir de processos anaeróbios pode servir como uma alternativa na redução dos custos operacionais e estruturais. Além disso, microrganismos com capacidade de sintetizar surfactina em anaerobiose são de interesse da indústria petroquímica, pois ambos, surfactina e microrganismo podem ser empregados na extração do petróleo a partir de poços esgotados. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo cinético da produção do biossurfactante surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia. Todos os ensaios foram realizados em biorreator operado de forma descontínua, em meio salino baseado na composição da água do mar (meio MM), acrescido de glicose e de NaNO_3 como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, além de outros micronutrientes. Inicialmente, para efeito comparativo, *B. subtilis* foi cultivado na presença e na ausência de oxigênio, em meio MM contendo 10 g.L^{-1} de glicose e $4,25 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 . Os resultados mostraram que a presença de oxigênio favoreceu a síntese de surfactina, resultando em maior produtividade, $4,92 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, em comparação ao anaeróbio, $1,84 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Os cultivos com diferentes relações carbono/nitrogênio (C/N) no meio MM, foram realizados com 10 g.L^{-1} de glicose e diferentes concentrações de NaNO_3 . Das condições testadas, a que se mostrou mais adequada foi a relação C/N 3,6, resultando em produção de $49,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e produtividade de $2,49 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em surfactina. A partir desta foram realizados dois cultivos no meio MM aumentando-se proporcionalmente as fontes de carbono e nitrogênio. A produtividade média de $1,75 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de surfactina, obtida nos cultivos contendo 15 e 20 g.L^{-1} de glicose foi inferior à produtividade alcançada com 10 g.L^{-1} de glicose, mostrando que houve efeito negativo com o aumento das concentrações. Avaliou-se também a produtividade em surfactina quando *B. subtilis* foi cultivado no meio mineral adicionado de micronutrientes (MM1) e de micronutrientes suplementado com 1 g.L^{-1} de extrato de levedura

(MM2), acrescido de 20 g.L^{-1} de glicose. A maior produção de $101,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e a maior produtividade de $3,39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em surfactina foram obtidas utilizando o meio MM2. Quando se avaliou a influência do aumento proporcional das fontes de carbono e de nitrogênio no MM2, os resultados mostraram efeito negativo sobre a produtividade em surfactina a partir do aumento na concentração de glicose. A produtividade foi de $3,18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $1,63 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de surfactina, nos cultivos contendo 30 e 40 g.L^{-1} de glicose, respectivamente. Os resultados mostraram que a maior produtividade em surfactina ($3,39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtida cultivando *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbico no meio MM2 contendo 20 g.L^{-1} de glicose. As velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de produção de biossurfactante (μ_P) correlacionaram-se bem, podendo-se então afirmar que a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 está associada ao crescimento celular. A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) confirmou que o biossurfactante produzido é um lipopeptídeo do tipo surfactina. A surfactina semipurificada se mostrou efetiva e eficaz, pois apresentou CMC de 10 mg.L^{-1} e foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $72,0$ para $29,9 \text{ mN.m}^{-1}$. A solução aquosa de surfactina exibiu excelente capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões formadas e, apresentou estabilidade na faixa de pH entre 6 e 8 , salinidade de até 10% de NaCl e tempo de exposição de 140 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Palavras-chave: surfactina, biossurfactante, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic compounds that have the ability to lower the surface and interfacial tension. Among the most effective biosurfactants are the lipopeptides produced by *Bacillus*, especially the surfactin. Due to their high production costs, its implementation is still limited, making necessary processes that economically allow its production. The production of surfactin from anaerobic processes can serve as an alternative in reduction of operational and structural costs. In addition, microorganisms capable of synthesizing surfactin anaerobically are interesting for petrochemical industry since both, surfactin and microorganism can be employed in the extraction of oil from depleted wells. This study aimed to perform a kinetic study of the production of surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 in anaerobic conditions. All assays were performed in a bioreactor operated discontinuously, in saline medium based on the composition seawater (MM medium) supplemented with NaNO_3 and glucose as carbon and nitrogen sources, respectively, and other micronutrients. Initially, for comparative purposes, *B. subtilis* was cultivated with and without oxygen, in MM medium containing 10 g.L^{-1} of glucose and 4.25 g.L^{-1} of NaNO_3 . Results showed that the presence of oxygen favored the surfactin synthesis, resulting in higher productivity, $4.92 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, compared to the anaerobic process that was $1.84 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cultures with different carbon/nitrogen (C/N) ratio in MM medium were performed at 10 g.L^{-1} glucose and different concentrations of NaNO_3 . Among the tested conditions, the C/N 3.6 had the best result, resulting in surfactin production and productivity of 49.7 mg.L^{-1} and $2.49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively. Based on these results, two cultures were performed in MM medium by increasing proportionally carbon and nitrogen concentrations. Average productivity in surfactin of $1.75 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, that was obtained in the culture containing 15 and 20 g.L^{-1} glucose was lower than the productivity achieved with 10 g.L^{-1} of glucose, showing that there was a negative effect of increasing concentrations. It also evaluated the productivity of surfactin when *B. subtilis* was grown on mineral medium supplemented with micronutrients (MM1) and added micronutrients and supplemented with 1 g.L^{-1} yeast extract (MM2) plus 20 g.L^{-1} glucose. The highest production of surfactin of 101.8 mg.L^{-1} and the highest productivity of $3.39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ were obtained using

MM2 medium. When it was evaluate the influence of the proportional increase of carbon and nitrogen sources in MM2, results showed negative effect on the surfactin productivity. The surfactin productivity was $3.18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and $1.63 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, in cultures containing 30 and 40 g.L^{-1} glucose, respectively. The results showed that the greater surfactin productivity ($3.39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was obtained by cultivating *B. subtilis* ATCC 21332 in an anaerobic bioreactor using MM2 as medium containing 20 g.L^{-1} glucose. From the specific growth rates (μ_x), substrate consumption (μ_s) and biosurfactant production (μ_p) data, it can be said that the surfactin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 its associated with cell growth. Analysis of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed that the biosurfactant produced in this work is surfactin. The semi purified surfactin was effective and efficient, since it presented a CMC of 10 mg.L^{-1} and was able to reduce the surface tension of water from 72.0 to 29.9 mN.m^{-1} . The aqueous solution of surfactin showed excellent emulsifying capacity and stability of emulsions formed and was stable in the pH range between 6 and 8, salinity up to 10 % NaCl and exposure time of 140 min at $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Key-words: surfactin, biosurfactant, *Bacillus subtilis*

NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

NB	Nutrient Broth
LB	Luria Bertani
OD	Oxigênio dissolvido ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMC	Diluição Micelar Crítica
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
MEOR	Recuperação Avançada de Petróleo por Microrganismos
MM	Meio mineral
MM1	Meio mineral adicionado de micronutrientes
MM2	Meio mineral adicionado de micronutrientes e suplementado de extrato de levedura
SDS	Dodecil sulfato de sódio
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (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 ($\text{mg}_{\text{surfactina}}\cdot\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$)
$Y_{C\text{-ACET}/C\text{-GLIC}}$	Fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($\text{g}_{C\text{-acetato}}\cdot\text{g}_{C\text{-glicose}}^{-1}$)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de biossurfactante (CMC: concentração micelar crítica). 28
- Figura 2.2 Estrutura química da surfactina A. 33
- Figura 2.3 Vias centrais do metabolismo da glicose em *Bacillus subtilis*. 40
- Figura 3.1 Representação esquemática dos ensaios cinéticos utilizando diferentes meios de cultivo e concentrações de substratos, para a produção de surfactina. 52
- Figura 3.2 Curva padrão que relaciona a tensão superficial à concentração de surfactina da marca Sigma[®], com grau de pureza de 98 %. 55
- Figura 4.1 Concentração celular de *B. subtilis* ATCC 21332 em função do tempo em incubador rotativo a 150 rpm e 30 °C. 65
- Figura 4.2 Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)), concentração de oxigênio dissolvido (OD (■)) e concentração de surfactina produzida (▲). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃). A linha contínua representa os ajustes polinomiais. 67
- Figura 4.3 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 cultivado em biorreator aerado. 67
- Figura 4.4 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. 71
- Figura 4.5 Concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NO₂⁻ (□), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○), durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃). 72
- Figura 4.6 Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em condições de anaerobiose em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃). 74
- Figura 4.7 Representação logarítmica da biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 em cultivo anaeróbico, em biorreator. 74
- Figura 4.8 Concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NO₂⁻ (□), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbico em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃). 77
- Figura 4.9 Velocidades específicas de crescimento (μ) de *B. subtilis* ATCC 21332 no cultivo em biorreator anaeróbico (◆) e em biorreator aerado (◇). . 79

Figura 4.10 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.	81
Figura 4.11 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (•)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N-NO_3^-$ (■), concentração de $N-NO_2^-$ (□), concentração de $N-NH_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio relação C/N 5,0 em meio MM (10 g.L ⁻¹ de glicose e 4,85 g.L ⁻¹ de $NaNO_3$).	82
Figura 4.12 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (•)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N-NO_3^-$ (■), concentração de $N-NH_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio relação C/N 4,2 em meio MM (10 g.L ⁻¹ de glicose e 5,82 g.L ⁻¹ de $NaNO_3$).	84
Figura 4.13 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (•)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N-NO_3^-$ (■), concentração de $N-NH_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio relação C/N 3,6 em meio MM (10 g.L ⁻¹ de glicose e 6,79 g.L ⁻¹ de $NaNO_3$).	87
Figura 4.14 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 durante os ensaios utilizando relação C/N 5,0 (a), C/N 4,2 (b) e C/N 3,6 (c).	90
Figura 4.15 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. (a) relação C/N 5,0, (b) relação C/N 4,2 e (c) relação C/N 3,6.	93
Figura 4.16 Gráficos representativos para classificação do produto formado nos ensaios em biorreator utilizando <i>B. subtilis</i> ATCC 21332, variando as relações C/N. (a) C/N 5,0, (b) C/N 4,2 e (c) C/N 3,6. (····) μ_X , (—) μ_S , (—) μ_p	94
Figura 4.17 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (•)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N-NO_3^-$ (■), concentração de $N-NH_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio A em meio MM (1 g.L ⁻¹ de extrato de levedura), adicionado de 15 g.L ⁻¹ de glicose e 10,2 g.L ⁻¹ de $NaNO_3$	97
Figura 4.18 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (•)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N-NO_3^-$ (■), concentração de $N-NH_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio B em meio	

MM (1 g.L ⁻¹ de extrato de levedura), adicionado de 20 g.L ⁻¹ de glicose e 13,6 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ .	98
Figura 4.19 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 durante os ensaios A (a) e B (b).	100
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 nos ensaios A (a) e B (b).	102
Figura 4.21 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO ₃ ⁻ (■), concentração de N-NH ₄ ⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio C em meio MM1 (1 g.L ⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 20 g.L ⁻¹ de glicose e 13,6 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ .	104
Figura 4.22 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO ₃ ⁻ (■), concentração de N-NH ₄ ⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio D em meio MM2 (2 g.L ⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 20 g.L ⁻¹ de glicose e 13,6 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ .	107
Figura 4.23 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 durante os ensaios C (a) e D (b).	109
Figura 4.24 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 nos ensaios C (a) e D (b).	111
Figura 4.25 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO ₃ ⁻ (■), concentração de N-NH ₄ ⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio E em meio MM2 (2 g.L ⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 30 g.L ⁻¹ de glicose e 20,3 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ .	113
Figura 4.26 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO ₃ ⁻ (■), concentração de N-NH ₄ ⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio F em meio MM2 (2 g.L ⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 40 g.L ⁻¹ de glicose e 27,1 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ .	115
Figura 4.27 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 durante os ensaios E (a) e F (b).	118
Figura 4.28 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 nos ensaios E (a) e F (b).	120

Figura 4.29 Gráficos representativos para classificação do produto formado nos ensaios em biorreator utilizando <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. Ensaios A (a), B (b), C (c), D (d), E (e) e F(f). (····) μ_X , (—) μ_S , (—) μ_P	122
Figura 4.30 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da surfactina padrão ((Sigma-Aldrich, pureza > 98 %) (—)) e do biossurfactante semipurificado (····) produzido por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio D, em 32 °C a 300 rpm.	125
Figura 4.31 Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina semipurificada produzida por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 no ensaio D a 32 °C e 300 rpm... 126	126
Figura 4.32 Índice de emulsificação (IE_{24}) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com o biossurfactante de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 () e o surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS ()).	129
Figura 4.33 Ilustração das emulsões (IE_{24}) da solução de 1 g.L ⁻¹ de biossurfactante de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 com diferentes hidrocarbonetos: (da esquerda para direita) n-hexadecano, óleo diesel, n-hexano, gasolina e isoctano.	129
Figura 4.34 Efeito do tratamento térmico a 100 °C em diferentes tempos de exposição nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L ⁻¹ do biossurfactante semipurificado produzido por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (□) e da mesma solução diluída 100 vezes (DMC ⁻²) (▲).	134
Figura 4.35 Efeito da salinidade nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L ⁻¹ do biossurfactante semipurificado produzido por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (□) e da mesma solução diluída 100 vezes (DMC ⁻²) (▲).	136
Figura 4.36 Efeito da variação do pH nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L ⁻¹ do biossurfactante semipurificado produzido por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (□) e da mesma solução diluída 100 vezes (DMC ⁻²) (▲).	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Concentração de glicose e NaNO_3 utilizada nos ensaios cinéticos com diferentes relações carbono/nitrogênio, em biorreator anaeróbio.....	49
Tabela 3.2 Concentração das fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (NaNO_3) adicionadas nos meios MM, MM1 e MM2, para os ensaios A, B, C, D, E e F, utilizando biorreator anaeróbio.....	49
Tabela 4.1 Resultados obtidos da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), produtividade em células (P_x), produtividade em surfactina (P_r) e fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), entre os ensaios em biorreator anaeróbio e biorreator aerado.	78
Tabela 4.2 Resultados da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET/C-GLIC}}$), entre os ensaios C/N 5,0, C/N 4,2 e C/N 3,6.....	91
Tabela 4.3 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET/C-GLIC}}$), entre os ensaios A e B.	101
Tabela 4.4 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET/C-GLIC}}$), entre os ensaios C e D.	109
Tabela 4.5 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET/C-GLIC}}$), entre os ensaios E e F.	119
Tabela 4.6 Índice de emulsificação (IE) e estabilidade da emulsão (EE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com o biossurfactante semipurificado de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (BS) e o surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS).	132
Tabela 7.1 Resumo dos resultados obtidos da concentração máxima de biomassa (X_{max}), produtividade em células (P_x), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), produção máxima de surfactina (P_{max}), produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET/C-GLIC}}$), entre todos os cultivos realizados utilizando <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.	167

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Objetivo geral	25
1.2	Objetivos específicos	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Biossurfactantes	27
2.1.1	Aplicações dos biossurfactantes	30
2.1.2	Surfactina	32
2.1.2.1	Fatores que afetam a produção de surfactina	36
2.2	Metabolismo anaeróbio em bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	38
2.2.1	Produção anaeróbia de biossurfactantes por <i>Bacillus</i> spp.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Microrganismo.....	45
3.2	Obtenção da cultura estoque de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	45
3.3	Meios de cultivo.....	46
3.4	Condições de cultivo.....	47
3.4.1	Cultivo em agitador orbital para a definição do tempo de incubação do inóculo.....	47
3.4.2	Cultivos em biorreator descontínuo	47
3.4.2.1	Avaliação da produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator aerado e anaeróbio (Etapa 1)	48
3.4.2.2	Influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) na produtividade em surfactina (Etapa 2) em biorreator anaeróbio	48
3.4.2.3	Influência do aumento nas concentrações de carbono e nitrogênio em diferentes meios de cultivo na produtividade em surfactina (Etapas 3, 4 e 5).....	49
3.4.2.4	Descrição das etapas realizadas nos cultivos em biorreator.....	50
3.5	Determinações analíticas	53
3.5.1	Determinação da concentração da biomassa.....	53
3.5.2	Determinação da concentração de glicose	53
3.5.3	Determinação do nitrato, nitrito e acetato.....	53
3.5.4	Determinação do íon amônio	54
3.5.5	Determinação da concentração de surfactina.....	54
3.5.5.1	Considerações a cerca da concentração de surfactina produzida....	56
3.5.6	Análise de tensão superficial e interfacial.....	56
3.5.7	Recuperação do biossurfactante.....	57
3.5.8	Caracterização e estabilidade do biossurfactante.....	57

3.5.8.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	58
3.5.8.2	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	58
3.5.8.3	Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão	58
3.5.8.4	Avaliação da estabilidade do biossurfactante	59
3.5.8.4.1	Estudo da estabilidade térmica.....	59
3.5.8.4.2	Estudo da estabilidade frente a variações da força iônica	60
3.5.8.4.3	Estudo da estabilidade frente a variações de pH.....	60
3.6	Tratamento dos dados.....	60
3.6.1	Ajuste dos dados.....	60
3.6.1.1	Velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina	60
3.6.1.2	Produtividade em células e em surfactina	61
3.6.1.3	Fatores de conversão	62
3.6.2	Análise estatística	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1	Cultivo em agitador orbital para a definição do tempo de incubação do inóculo	65
4.2	Ensaio em biorreator.....	66
4.2.1	Avaliação da produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 em biorreator aerado e anaeróbio (Etapa 1 da Figura 3.1).....	66
4.2.2	Influência da relação carbono-nitrogênio (C/N) na produtividade em surfactina (Etapa 2 da Figura 3.1).....	81
4.2.3	Influência do aumento proporcional nas concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio em diferentes meios de cultivo na produtividade em surfactina (Etapas 3, 4 e 5 da Figura 3.1).....	96
4.3	Caracterização e estabilidade do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	124
4.3.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	124
4.3.2	Tensão superficial, interfacial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	126
4.3.3	Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão em diferentes hidrocarbonetos.....	128
4.3.4	Estudo da estabilidade do biossurfactante	134
5	CONCLUSÕES.....	141
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	143
7	REFERÊNCIAS	145

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes ou tensoativos constituem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais. A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são derivados do petróleo e são parcialmente biodegradáveis, causando efeitos prejudiciais ao meio ambiente (NITSCHKE; PASTORE, 2002; VAZ et al., 2012). Alguns microrganismos como bactérias, fungos e leveduras podem sintetizar compostos orgânicos que exibem atividade superficial, conhecidos como biossurfactantes, e estes podem ser encontrados na superfície das células microbianas ou excretados extracelularmente (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas contendo uma porção apolar, frequentemente composta por uma cadeia hidrocarbônica, e uma porção polar, composta por grupamentos carboxílicos ou aminoácidos (DESAI; BANAT, 1997). Esta característica anfifílica da molécula é o que lhe confere propriedades surfactantes, isto é, permite que ela se acumule entre as fases do fluido, reduzindo assim as tensões superficiais (líquido-ar) e interfaciais (líquido-líquido) e também exibindo alta capacidade emulsificante (DE FARIA et al., 2011). Os biossurfactantes apresentam ainda funções fisiológicas podendo-se destacar a solubilização de hidrocarbonetos, emulsificação e alguns apresentam, ainda, atividade antibiótica (FRANCY et al., 1991). Atualmente os biossurfactantes têm sido foco de extensivas pesquisas em função de sua baixa toxicidade, alta compatibilidade ambiental, biodegradabilidade, síntese a partir de matérias primas renováveis e efetividade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Essas propriedades se apresentam como vantagens em relação aos surfactantes químicos, tornando-os assim uma alternativa promissora em substituição a estes (DESAI; BANAT, 1997).

Bacillus subtilis é uma bactéria conhecida pela sua capacidade de produzir biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos, destacando-se a surfactina como o mais estudado e mais efetivo (DESAI; BANAT, 1997). Devido as propriedades e funções fisiológicas dos biossurfactantes, especificamente a surfactina, as aplicações potenciais tornam-se abrangentes, especialmente nas áreas ambiental, atuando na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBITTO et al., 2004), na biorremediação de solos contaminados por zinco e cobre

(MULLIGAN, 2005) e na remoção de óleos de areia contaminada com óleo diesel (MARIN et al., 2015). Além disso tem interesse na área farmacêutica, exibindo propriedades antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória (GUDIÑA^b et al., 2013).

A utilização da surfactina destaca-se também na Recuperação Avançada de Petróleo por Microrganismos - MEOR (NITSCHKE; PASTORE, 2002; YOUSSEF et al., 2013). A MEOR consiste no emprego de microrganismos ou de metabólitos microbianos, como os biossurfactantes, a fim de aumentar a recuperação de petróleo (LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007) e tem sido apontada como uma técnica promissora para a recuperação de petróleo adicional de reservatórios esgotados (YOUSSEF et al., 2007). Dentre as diversas estratégias existentes para a implementação da MEOR, destaca-se a MEOR *in situ*, a qual consiste na injeção de microrganismos juntamente com nutrientes necessários para seu crescimento e produção de biossurfactante *in situ*. (YOUSSEF et al., 2007).

Apesar da variada aplicabilidade da surfactina seu uso ainda é limitado devido aos elevados custos de produção, baixos rendimentos e métodos ineficientes de recuperação (FOX; BALA, 2000). Estima-se que os processos de *downstream* possam representar cerca de 60 % dos custos totais de produção (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Entretanto, o emprego da surfactina na MEOR *in situ* não exige que o produto seja purificado, o que evidentemente pode vir a reduzir os custos envolvidos na produção deste tipo de composto.

Tendo em vista a redução dos custos de processo, a produção de surfactina a partir de resíduos agroindustriais, tornou-se tema de muitas pesquisas (GUDIÑA et al., 2015; MARIN et al., 2015). Todavia os estudos nessa área estão voltados para a produção através de processos aeróbios. Apesar do menor rendimento destes biossurfactantes em processos anaeróbios, a produção de surfactina em anaerobiose pode servir como alternativa na redução dos custos, visto que é um processo menos dispendioso por não necessitar de fornecimento de O₂ e, ainda, apresenta a vantagem da não formação da espuma, problema comum dos processos aeróbios.

Embora a literatura possua vasta informação a cerca da produção de surfactina por *Bacillus subtilis*, esta fica limitada quando o processo é dirigido a condições anaeróbias, sendo que a maioria dos estudos nessa área foram realizados com *Bacillus licheniformis*

(JAVAHERI et al., 1985; YAKIMOV et al., 1995; GOGOTOV; MIROSHNIKOV, 2009). Dessa forma, até o momento, pouco se sabe sobre a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* em anaerobiose, sendo necessário mais investigações sobre a cinética de produção e os fatores nutricionais que aumentam a produtividade em surfactina frente a esta condição.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em parceria com a Petrobras, desenvolveu pesquisas sobre a produção de biosurfactantes entre os anos de 2007 e 2014. Os estudos de produção foram realizados em anaerobiose, a partir de um consórcio microbiano proveniente de água de produção de um poço de petróleo *offshore*, utilizando como meio de cultivo água do mar sintética. O interesse na produção do biosurfactante esteve atrelado à sua aplicabilidade na MEOR *in situ*, motivo pelo qual os experimentos foram conduzidos em meio com alta salinidade sob condição anaeróbia, de forma a tentar reproduzir as condições ambientais adversas do reservatório. Com base nessa parceria e considerando uma possível aplicação na MEOR *in situ*, foi proposto realizar um estudo a cerca da produção de surfactina em condição anaeróbia, tendo em vista a redução dos custos, utilizando meio salino empregando uma cultura pura.

1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção e a estabilidade da surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia em meios com diferentes nutrientes.

1.2 Objetivos específicos

- a) Realizar estudo cinético da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado e anaeróbio;
- b) Estudar a influência da relação carbono-nitrogênio (C/N) na produtividade em surfactina em anaerobiose;
- c) Avaliar o efeito sobre a produtividade em surfactina do aumento das concentrações de carbono e nitrogênio

- (proporcionalmente a partir da relação C/N previamente estabelecida);
- d) Investigar a influência da suplementação do meio de cultivo com micronutrientes e/ou micronutrientes e extrato de levedura na produtividade em surfactina;
 - e) Estudar o aumento proporcional das fontes de carbono e nitrogênio utilizando meio adicionado de micronutrientes e suplementado de extrato de levedura na produtividade em surfactina em biorreator anaeróbio;
 - f) Caracterizar a molécula e as propriedades físico-químicas da surfactina produzida em condição anaeróbia e a partir de meio mineral adicionado de micronutrientes e suplementado com extrato de levedura;
 - g) Estudar a capacidade da surfactina produzida de emulsificar diferentes hidrocarbonetos e avaliar a estabilidade por medidas da tensão superficial frente a variações no pH, salinidade e tempo de exposição a elevada temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

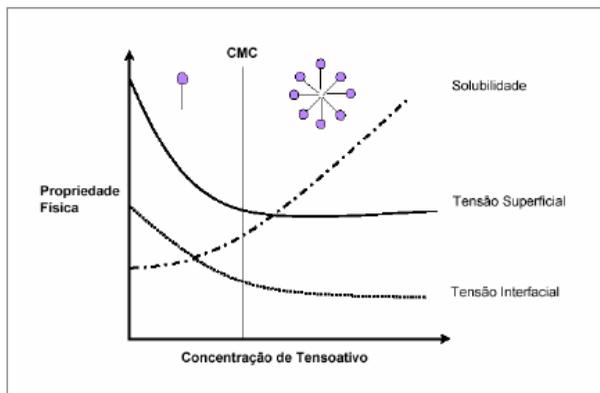
2.1 Biossurfactantes

Os surfactantes ou tensoativos podem ser definidos como compostos constituídos por moléculas anfifílicas contendo uma porção hidrofóbica, geralmente composta por hidrocarbonetos e uma porção hidrofílica, composta por grupamentos aniônicos, catiônicos ou não-iônicos (DESAI; BANAT, 1997). Os surfactantes podem ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou então, podem ser sintetizados por organismos vivos, como plantas (saponinas) ou microrganismos (lipopeptídeos) (BOGNOLO, 1999; MAIER, 2003).

Os compostos de origem microbiana que possuem propriedades surfactantes, isto é, que diminuem as tensões superficiais e interfaciais e exibem alta capacidade emulsificante (capacidade de misturar dois líquidos imiscíveis, formando uma emulsão estável) são denominados biossurfactantes e são constituídos de produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (CRASTO, 2005).

Quando um agente tensoativo é adicionado a sistemas água/ar ou água/óleo em concentrações crescentes, uma redução das tensões superficiais e interfaciais é observada até um nível crítico, acima do qual as moléculas anfifílicas se associam prontamente para formar estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas, não mais provocando redução das mencionadas tensões. Este valor é conhecido como Concentração Micelar Crítica (CMC) (DESAI; BANAT, 1997), podendo ainda ser definido como a mínima concentração necessária para que as tensões sejam reduzidas ao máximo (MULLIGAN, 2005). A Figura 2.1 mostra a relação entre a concentração do biossurfactante e as suas propriedades físicas.

Figura 2.1 Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de biossurfactante (CMC: concentração micelar crítica).



Fonte: MULLIGAN et al., 2001.

As características básicas essenciais que determinam um bom biossurfactante são a eficiência e a efetividade. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg.L⁻¹ (MULLIGAN; GIBBS, 1993), enquanto a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007), as quais devem atingir valores menores que 30 mN.m⁻¹ e 1 mN.m⁻¹, respectivamente (MULLIGAN; GIBBS 1993). Quanto menor o valor da CMC mais eficiente é considerado o biossurfactante (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011), especialmente do ponto de vista econômico para aplicações industriais.

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e origem microbiana, diferentemente dos surfactantes químicos que são classificados de acordo com a natureza do seu grupo apolar (DESAI; DESAI, 1993). De maneira geral, eles podem ser divididos em dois grandes grupos: biossurfactantes de alta massa molecular, conhecidos também como bioemulsificantes (biossurfactantes poliméricos e particulados), os quais produzem emulsões em meio aquoso e não são normalmente excretados; e biossurfactantes de baixa massa molecular (lipopeptídeos e

glicolipídeos), os quais são excretados para o meio ambiente, a fim de reduzir a tensão superficial do meio (RON; ROSENBERG, 2001). Dentre a classe dos lipopeptídeos, a surfactina é o representante mais conhecido, e dentre os glicolipídeos encontram-se os ramnolipídeos.

Devido à grande diversidade de microrganismos produtores de biossurfactantes e substratos utilizados, os biossurfactantes apresentam diferentes funções fisiológicas, sendo que as principais incluem emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando assim o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY et al., 1991). Além disso, possuem atividade antibiótica, demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. A surfactina de *B. subtilis* funciona como antibiótico solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbiana. Por meio da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996). A fração lipídica das membranas biológicas é composta principalmente de fosfolipídios, a qual se diferencia pelo comprimento da cadeia e pelo caráter iônico, que pode ter influência na atividade de surfactina. De acordo com Kuzmin et al. (2005) a surfactina interfere mais intensamente em membranas contendo fosfolipídios que possuem cadeias mais curtas e/ou estão em organização fluída. As interações da surfactina com membranas biológicas são conhecidas por determinar a sua atividade biológica e envolvem a inserção nas bicamadas lipídicas, modificando a permeabilidade da membrana pela formação de canais iônicos ou por carrear cátions mono ou di-valentes e solubilizando a membrana por seu mecanismo detergente (HEERKLOTZ; SEELIG, 2007).

Os biossurfactantes oferecem vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; COSTA et al., 2006); são efetivos em ampla faixa de temperatura, pH e força iônica (AL-WAHAIBI et al., 2014; BEZZA; CHIRWA, 2015; LIU et al., 2015); podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (DE OLIVEIRA et al., 2013; GUDIÑA et al., 2015; MARIN et al., 2015); e apresentam valores de CMC menores que os surfactantes químicos (VAZ et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2013). Apesar das várias vantagens apontadas para os biossurfactantes, podem-se destacar

algumas desvantagens, tais como: elevados custos para a produção em larga escala; baixa produtividade das linhagens; dificuldade em se obter produtos puros, importantes na aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos; regulação da síntese de biossurfactante é pouco compreendida; e o aumento da produção tem como consequência a formação de grande volume de espuma, impedindo a manutenção do processo (KOSARIC, 1992).

Dentre a gama de biossurfactantes os lipopeptídeos estão entre os mais eficientes (ZAJIC; SEFFENS, 1984). A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* é o lipopeptídeo mais estudado (PEREIRA et al., 2013) e também considerado o mais efetivo (SCHALLER et al., 2004).

2.1.1 Aplicações dos biossurfactantes

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é produzida a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental e o maior nível de exigência das legislações ambientais em diferentes países, impulsionaram pesquisas à procura de biossurfactantes como alternativa aos produtos convencionais. Além disso, devido às propriedades e funções fisiológicas dos biossurfactantes, o seu campo de aplicação se tornou bastante abrangente, podendo ser empregados na indústria de processamento de alimentos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011), na biorremediação (NETO et al., 2009; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; BEZZA; CHIRWA, 2015), nas indústrias de detergentes, farmacêutica e de cosméticos (WANG et al., 2008; HÖRMANN et al., 2010) e na Recuperação Avançada do Petróleo por Microrganismos - MEOR (YOUSSEF et al., 2013; AL-WAHAIBI et al., 2014; BEZZA; CHIRWA, 2015; LIU et al., 2015). No entanto, os principais usos dos biossurfactantes relacionam-se à indústria petrolífera, a qual não requer alto grau de pureza. Nesse campo podem ser utilizados na recuperação avançada de petróleo, na remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, na biorremediação e dispersão no derramamento de óleos e na incorporação em formulações de óleos lubrificantes (LIMA, 1996). Porém, o maior interesse industrial dos biossurfactantes reside nas aplicações da MEOR (KIM et al., 2000).

A MEOR é um método terciário e apresenta-se como uma forma atrativa para recuperar o petróleo adicional de reservatórios esgotados (BROWN, 2010; ZHANG; XIANG, 2010). A utilização de biossurfactantes na MEOR envolve três diferentes estratégias: injeção de células de uma cultura metabolicamente ativa no reservatório, acompanhada da injeção de nutrientes necessários ao seu crescimento e produção *in situ* (1); a produção de biossurfactante em cultura contínua ou em batelada, em escalas industriais, seguida da adição desses compostos no reservatório juntamente com a água de injeção, sendo esse processo denominado MEOR *ex situ* (2); a adição de nutrientes selecionados ao reservatório, para estimular o crescimento da microbiota produtora de biossurfactante (3) (BANAT, 1995).

Como mencionado, a MEOR consiste no emprego dos próprios microrganismos ou de metabólitos microbianos, a fim de se obterem diversos efeitos que aumentem a recuperação do petróleo. Estes efeitos incluem: a formação de gases (CO_2 e CH_4) e aumento da pressão; produção de ácidos (acético e butírico) e degradação da matriz calcária; produção de solventes e redução na viscosidade do óleo; produção de polímeros; produção de biossurfactantes (lipopeptídeos) resultando na redução da tensão interfacial rocha-óleo-água de injeção; formação de biomassa microbiana, que promove um bloqueio seletivo nas zonas de alta permeabilidade (LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007).

A utilização de biossurfactante como método MEOR tem propiciado aumentos satisfatórios na recuperação de petróleo, em experimentos de campo (YOUSSEF et al., 2007; YOUSSEF et al., 2013) e de laboratório, utilizando colunas empacotadas com areia (JOSHI; BHARUCHA; DESAI, 2008; GUDIÑA^a et al., 2013) e núcleos de arenito (AL-BAHRY et al., 2013) bem como, o prolongamento da vida útil de reservatórios onde a prática foi implantada (BROWN; VADIE; STEPHENS, 2002; LI et al., 2002).

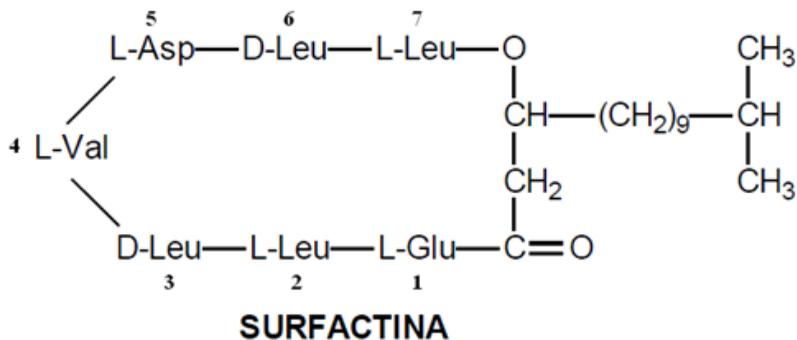
Aplicações ambientais como biorremediação de solos contaminados com óleo bruto e o processo MEOR requerem grandes quantidades de biossurfactante. Como a maioria dos microrganismos produtores de biossurfactantes é de natureza aeróbia, a produção destes fica limitada pela presença de oxigênio, requerendo aeração através do bombeamento de ar, ou através do uso de compostos que liberem oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, o que ocasiona aumentos adicionais nos custos do processo. Dessa forma, microrganismos

capazes de produzir biossurfactantes em condições anaeróbias *in situ* são de fundamental importância na indústria de petróleo, principalmente porque os reservatórios de petróleo são anaeróbios (MACHEL; FOGHT, 2000).

2.1.2 Surfactina

A surfactina (massa molar $1036,34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) pode ser produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* (KOWALL et al., 1998; COSTA, 2005). O primeiro relato sobre a produção de surfactina ocorreu em 1968 (ARIMA et al., 1968), com a apresentação de um novo composto biologicamente ativo presente no meio de cultivo de *B. subtilis*, o qual exibiu excelente atividade surfactante. A estrutura química da surfactina foi posteriormente elucidada por Kakinuma et al. (1969), como sendo a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi através de um anel lactona. A surfactina subdivide-se em 3 isoformas: Surfactinas A, B e C, que diferem na composição dos aminoácidos da parte peptídica. As isoformas da surfactina podem ainda ser subdivididas em séries homólogas, que se diferem através do número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica, que pode variar de 13 a 15 átomos, sendo o ácido 3 hidróxi-13-metiltetradecanóico seu principal componente (KAKINUMA et al., 1969; KOWALL et al., 1998). A principal isoforma, surfactina A, possui em sua porção peptídica a sequência de aminoácidos L-Glutamina, L-Leucina, D-Leucina, L-Valina, L-Aspargina, D-Leucina, L-Leucina (Figura 2.2). As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido, entre Leucina (surfactina A), Valina (surfactina B) e Isoleucina (surfactina C) (LIU; YANG; MU, 2008). Kowall et al. (1998) relataram que a atividade biológica da surfactina depende tanto da composição de aminoácidos e da sequência do peptídeo, como da natureza da sua parte lipídica. As proporções das isoformas produzidas dependem da linhagem e das condições ambientais e nutricionais em que o biossurfactante foi produzido (LIU; YANG; MU, 2008).

Figura 2.2 Estrutura química da surfactina A.



Fonte: Adaptado de CAMEOTRA e MAKKAR, 1998.

A surfactina, principal representante da família dos lipopeptídeos, é conhecida por apresentar excepcional atividade superficial. A surfactina apresenta uma CMC em água de 25 mg.L^{-1} , capaz de reduzir a tensão superficial da água ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) de 72 mN.m^{-1} para 27 mN.m^{-1} , além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano para 1 mN.m^{-1} (COOPER et al., 1981). Os valores relatados para a CMC da surfactina encontram-se em torno de 10 mg.L^{-1} (DE OLIVEIRA et al., 2013), $12,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (HUANG et al., 2015) e 20 mg.L^{-1} (GUDIÑA et al., 2012; LIU et al. 2015).

De acordo com Desai e Banat (1997), o estudo cinético da produção dos biossurfactantes possui muitas variações dentre os sistemas e poucas generalizações podem ser descritas. Em alguns casos uma maior produção de surfactina foi alcançada em condições limitantes do crescimento, pela limitação de nitrogênio e de cátions multivalentes (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987). Em outros como, por exemplo, no estudo realizado por Sullivan (1998), os genes que regulam a produção de surfactina são regulados por dois sistemas de *quorum sensing*, sendo que um deles possui a habilidade para monitorar a densidade celular. Já Cooper et al. (1981) sugeriram que a produção de surfactina estava associada ao crescimento, enquanto Coutte et al. (2010) observaram que a produção ocorria ao final da fase exponencial de crescimento.

As propriedades surfactantes da surfactina apresentam dependência aos valores do pH, pois a acidificação da solução para pH igual a 2 eleva a tensão superficial para 62 mN.m^{-1} , voltando para 27 mN.m^{-1} com a neutralização (pH 6). Isto ocorre devido ao fato da surfactina precipitar em meio ácido sem ter sua estrutura alterada. Esta característica constitui uma vantagem adicional, pois mesmo quando submetida a condições mais extremas de pH, a molécula de surfactina conserva sua estrutura química original (COOPER et al., 1981).

Os altos custos de produção e baixos rendimentos de surfactina têm limitado o seu emprego em aplicações comerciais (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Estima-se que a quantidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir em 10-30 % dos custos totais de produção na maioria dos processos biotecnológicos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). No entanto, a recuperação, concentração e purificação dos biossurfactantes representam a maior parte dos custos totais da produção (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Os processos de *downstream* podem representar cerca de 60 % dos custos totais de produção do produto, isto porque os produtos de fermentação, incluindo os biossurfactantes, são secretados como uma solução diluída (DESAI; DESAI, 1993; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

A surfactina é um produto de alto valor agregado, pois esta (98 % de pureza) comercializada pela Sigma Chemical Company pode chegar a R\$ 5.165,00 a cada 50 mg (R\$ 103.300,00.g⁻¹) (SIGMA-ALDRICH, 2015). No entanto, para algumas aplicações industriais, como a MEOR, não se exige que o produto seja purificado, reduzindo assim os custos do produto. Segundo Makkar, Cameotra e Banat (2011) em comparação ao custo de surfactantes químicos, que ficam em torno de 1 dólar.lb⁻¹ (R\$ 0,007.g⁻¹), os preços dos biossurfactantes são mais elevados, porém quando se leva em consideração os danos ambientais que os surfactantes químicos podem causar, o custo acaba sendo muito maior do que um dólar. Desai e Banat (1997) relataram que o custo de produção dos biossurfactantes é de aproximadamente três a dez vezes maior do que os surfactantes químicos. De acordo com Makkar, Cameotra e Banat (2011) o cenário perfeito seria ter biossurfactantes com preços de mercado na faixa de 3-5 dólares.lb⁻¹ (R\$ 0,03.g⁻¹).

Outros fatores que provocam o aumento dos custos da produção são a aeração e a agitação em processos aeróbios, necessários para manter os altos valores de concentração de oxigênio dissolvido. De

acordo com Schmidell et al. (2001) para um processo aeróbio ser altamente eficiente há, obrigatoriamente, a necessidade da existência de oxigênio dissolvido no meio. No entanto, esse elemento é pouco solúvel em água, a concentração de oxigênio dissolvido na saturação é apenas da ordem de $7 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, (1 atm e a $35 \text{ }^\circ\text{C}$). É importante ressaltar que esse valor não é mantido quando substâncias químicas (como os nutrientes) são dissolvidas em um líquido, provocando uma redução da concentração de oxigênio dissolvido. Ao longo do tempo de um processo biológico os microrganismos consomem esses nutrientes e lançam ao meio produtos metabólicos, agravando ainda mais a dissolução do oxigênio. Isso significa que a composição química do meio de cultura é alterada a cada instante do processo, o que pode causar alterações da concentração de oxigênio dissolvido.

De acordo com Fahim et al. (2013), a produção de biossurfactantes requer o desenvolvimento de biorreatores que permitam o suprimento suficiente de oxigênio e o controle da formação de espuma. A formação de espuma é um dos problemas comuns quando se trata da produção de surfactina em aerobiose e tem se tornado o principal desafio na produção deste composto. A espuma é originada pela alta velocidade de agitação e aeração necessárias para fornecer quantidades suficientes de oxigênio para os cultivos. A formação de espuma causa problemas, incluindo o deslocamento indesejável do produto, de nutrientes e de células, podendo tornar o processo de difícil contenção. Além disso, é comum que os tanques dos biorreatores tenham que ser operados com um excesso de *headspace*, para acomodar a imprevisível formação de espuma. Isto aumenta o custo do biorreator, reduzindo a produtividade do sistema (KOCH et al., 1995).

A estabilização da espuma por meio da adição de antiespumantes ao meio de cultura é uma estratégia comumente empregada em processos aeróbios, no entanto, a adição desses abriga desvantagens por apresentar custo elevado e pela dificuldade de remoção nos processos de *downstream*. O rompimento da espuma por cisalhamento ou pressão através de disjuntores foi relatado, porém, este método é muitas vezes insuficiente e aumenta os custos totais de produção (WILLENBACHER et al., 2015). De acordo Kronemberger et al. (2008) uma forma de contornar a formação de espuma é por meio da oxigenação não-dispersiva, os autores desenvolveram um sistema de membranas acoplado a um biorreator que permite a oxigenação do meio

de cultivo sem borbulhamento de ar, eliminando a formação de espuma durante o processo. Outra forma de controlar a formação de espuma é através do fracionamento de espuma, que já foi demonstrado por Cooper et al. (1981). Segundo Willenbacher et al. (2014) este método é uma possível forma de lidar com a espuma formada, entretanto, os mesmos autores em um estudo subsequente relataram que uma realização em escala industrial é provavelmente irreal num futuro próximo (WILLENBACHER et al., 2015). Estes autores destacaram a importância da produção anaeróbia de surfactina como uma alternativa em substituição aos processos aeróbios, visando uma produção livre de espuma, a fim de diminuir os elevados custos gerados pelas construções complexas que os processos aeróbios requerem.

2.1.2.1 Fatores que afetam a produção de surfactina

Estudos que visam o aumento da produção de surfactina têm sido realizados tanto em frascos agitados (PEREIRA et al., 2013; GUDIÑA et al., 2015; HUANG et al., 2015), como em biorreatores operando em sistemas contínuos (COOPER et al., 1981), descontínuos (COUTTE et al., 2010; WILLENBACHER et al., 2015) ou descontínuos alimentado (BENCE, 2011; DE LIMA JUNIOR, 2012). Pesquisas sobre a influência das condições nutricionais foram realizadas com a finalidade de se obterem condições ótimas de produção de surfactina. A avaliação das fontes de carbono e nitrogênio (FONSECA et al., 2007; PEREIRA et al., 2013), da adição de extrato de levedura (ROCHA et al., 2009), bem como micronutrientes, como manganês e ferro (ABDELMAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008; GUDIÑA et al., 2015) tem mostrado influência sobre a biossíntese de surfactina. Além disso, fatores como temperatura, pH, agitação e aeração (SEN; SWAMINATHAN, 1997) também têm sido variáveis de estudo na produção de surfactina.

Pereira et al. (2013) estudaram a produção aeróbia de surfactina a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por *Bacillus subtilis*, em cultivos realizados em frascos agitados. Das fontes de carbono testadas, para os 3 isolados, sacarose foi a que apresentou o menor valor da tensão superficial, variando entre 27,8-28,4 mN.m⁻¹. Os resultados apontaram extrato de levedura e sulfato de amônio como as

melhores fontes de nitrogênio. As concentrações de biossurfactantes ficaram em torno de 931-980 mg.L⁻¹ e a CMC entre 20-30 mg.L⁻¹.

O efeito da suplementação do meio de cultura com extrato de levedura sobre a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI008 foi avaliada por Rocha et al. (2009). Os cultivos realizados em frascos agitados foram conduzidos a 30 °C e 180 rpm, em meio mineral contendo 10 g.L⁻¹ de glicose, com suplementação ou não de 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura. A produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI008 foi estimulada na presença de extrato de levedura, obtendo-se redução de 24,1 % da tensão superficial, após 72 h de cultivo.

Fonseca et al. (2007) estudaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio (uréia, levedura residual de cervejaria, sulfato de amônio, nitrato de sódio e nitrato de amônio) no meio de cultivo contendo 10 g.L⁻¹ de sacarose, sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* YRE207. Os cultivos foram realizados em frascos agitados na temperatura de 30 °C e 150 rpm. A maior produção de surfactina foi obtida quando nitrato de amônio foi utilizado, com redução de 52,8 % na tensão superficial. Os autores estudaram a otimização da relação C/N (3, 9 e 15 gC.gN⁻¹), mantendo a concentração de 10 g.L⁻¹ de sacarose constante e variando a concentração de NH₄NO₃, e a velocidade de agitação (50, 150 e 250 rpm). A condição que mais favoreceu a produção do biossurfactante foi a relação C/N 3 e a agitação de 250 rpm.

O efeito da adição de diferentes íons metálicos, como ferro, manganês e magnésio, sobre a produção de surfactina foi avaliada por Gudiña et al. (2015). Os cultivos foram conduzidos em agitador orbital a 37 °C e 200 rpm, a partir da cepa *B. subtilis* #573 em meio de cultura contendo 10 % de licor de milho, como fonte de carbono. A adição de íons metálicos promoveu aumento satisfatório na produção de surfactina quando comparado a amostra sem suplementação. A produção de 1,3 g.L⁻¹ de surfactina aumentou para 4,1, 4,4 e 3,5 g.L⁻¹, quando 2,0 mM de FeSO₄, 0,2 mM de MnSO₄ e 0,8 mM de MgSO₄, respectivamente, foram adicionados ao meio de cultivo. Em estudo realizado por Huang et al. (2015), cujo objetivo foi elucidar o efeito da adição de diferentes concentrações de Mn²⁺ sobre a produção de surfactina, o mesmo comportamento foi verificado em cultivos com *B. subtilis* ATCC 21332, onde a concentração de surfactina aumentou de 0,24 para 1,5 g.L⁻¹, quando adicionou-se 0,1 mM do íon metálico Mn²⁺.

Chen, Baker e Darton (2006) investigaram a produção de surfactina por *B. subtilis* BBK006 em biorreator descontínuo com fracionamento de espuma e compararam o desempenho do biorreator com a produção de surfactina obtida em agitador orbital, sendo ambos os cultivos realizados em meio definido contendo 2 g.L^{-1} de glicose. A eficiência do processo em biorreator foi demonstrada pela maior produção de surfactina, 136 mg.L^{-1} , em comparação a produção obtida em agitador orbital que foi de 92 mg.L^{-1} . Bence (2011) também observou maior produção de surfactina (1737 mg.L^{-1}) em biorreator descontínuo, em comparação a produção em agitador orbital (652 mg.L^{-1}), quando cultivou *B. subtilis* ATCC 21332 em meio definido contendo 40 g.L^{-1} de glicose sob condição aeróbia. O autor também estudou a produção de surfactina em biorreator descontínuo alimentado, onde duas estratégias de alimentação foram utilizadas, uma com vazão de alimentação constante e a outra com vazão de alimentação exponencial. Para as duas estratégias empregadas as maiores produções de surfactina foram obtidas com as mais altas vazões de alimentação. As produções máximas de 544 mg.L^{-1} e 633 mg.L^{-1} de surfactina foram alcançadas com vazão de alimentação constante de $0,4 \text{ L.h}^{-1}$ e vazão de alimentação variando exponencialmente entre $0,8$ e $1,57 \text{ L.h}^{-1}$. O autor afirma que a produção de surfactina foi mantida durante a fase de alimentação e sugere que cultivos em biorreator descontínuo alimentado podem ser usados como um processo estratégico para aumentos na produção de surfactina.

2.2 Metabolismo anaeróbio em bactérias do gênero *Bacillus*

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, capaz de crescer em aerobiose e anaerobiose (NAKANO; HULETT 1997). Devido à grande resistência de seus esporos e à alta habilidade metabólica das células vegetativas, *B. subtilis* é um dos microrganismos mais estudados e caracterizados, utilizado tanto na pesquisa básica quanto em microbiologia aplicada (IVANOVA et al., 1999).

B. subtilis foi classificado como aeróbio estrito por muitos anos, sendo apenas em 1993 identificado seu metabolismo anaeróbio (PRIEST, 1993). Este microrganismo é capaz de crescer em anaerobiose, seja pela utilização de nitrato como acceptor final de

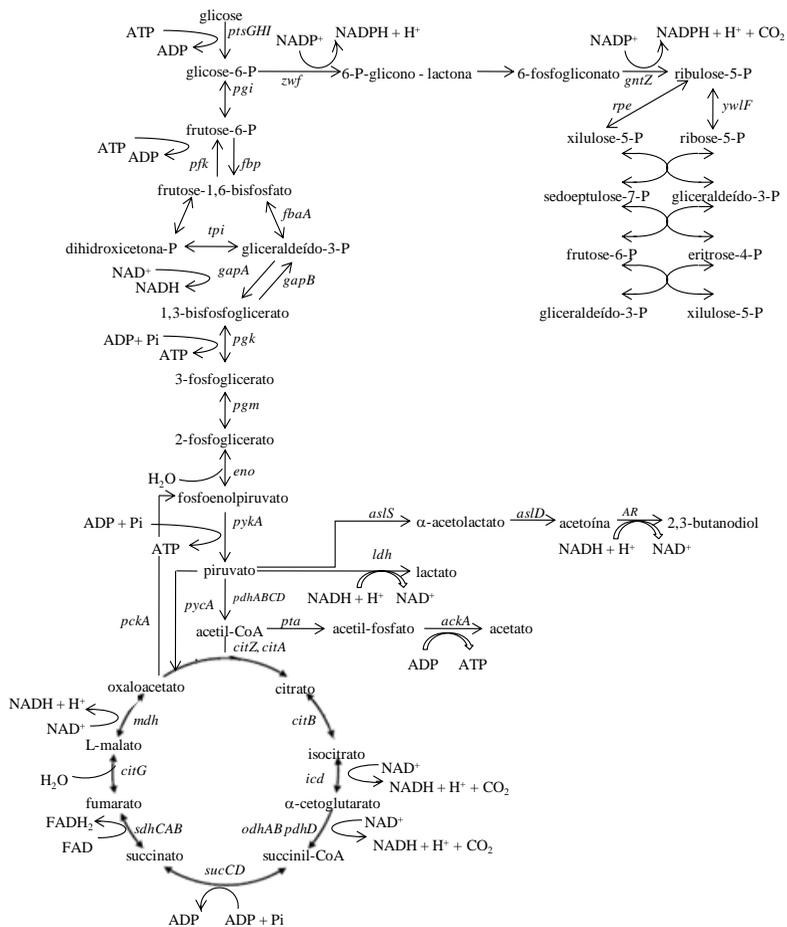
elétrons ou por fermentação na ausência de aceptores (NAKANO et al., 1997). Porém, a via de fermentação de *B. subtilis* não é bem definida, de acordo com Nakano et al. (1997) a fermentação da glicose é considerada ineficiente. No entanto, esta via é estimulada na presença de piruvato ou de uma mistura de 20 aminoácidos, mas as razões pelas quais isso ocorre são desconhecidas. Uma das hipóteses é que a quantidade de piruvato, acumulado pela glicólise, não é suficiente para induzir a expressão de genes envolvidos no catabolismo fermentativo deste, ou para ativar as enzimas que nele participam. Neste caso a adição de aminoácidos poderia estimular a fermentação, uma vez que alguns aminoácidos podem gerar piruvato.

Segundo Sonenshein (2002) *B. subtilis* cataboliza glicose através das vias glicolítica e pentose fosfato (Figura 2.3). O piruvato formando pode ser oxidado a acetil coenzima A (acetil-CoA) ou ainda ser utilizado para regenerar o NAD^+ em fermentação. Acetil-CoA pode ser oxidada no ciclo de Krebs, com geração de equivalentes redutores e doadores de elétrons para geração de energia na cadeia transportadora de elétrons. De acordo com Deutscher et al. (2002), a energia da ligação tioéster da acetil-CoA pode ser direcionada para fosforilação do substrato para formação de acetato e com geração de ATP.

Ramos et al. (2000) cultivando *B. subtilis* em meio definido contendo glicose e piruvato, na ausência e na presença de N-NO_3^- ou N-NO_2^- como aceptor final de elétrons, mostraram que a adição de um aceptor final de elétrons no meio de cultivo não causou mudanças drásticas na formação dos produtos da fermentação. A formação de lactato, acetato e 2,3-butanodiol como produtos indicaram a presença de várias rotas metabólicas durante o cultivo em anaerobiose. De acordo com os autores a formação de acetato é em geral parte do metabolismo aeróbio e anaeróbio de *B. subtilis*.

Os resultados encontrados por Blencke et al. (2003), utilizando glicose como fonte de carbono para o crescimento de *B. subtilis*, apontam que na presença de glicose a produção de acetato é induzida. Por outro lado, os genes necessários para a oxidação da acetil-CoA via ciclo de Krebs são reprimidos.

Figura 2.3 Vias centrais do metabolismo da glicose em *Bacillus subtilis*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

2.2.1 Produção anaeróbia de biossurfactantes por *Bacillus* spp.

Embora a produção de biossurfactante pelo gênero *Bacillus* esteja bem difundida na literatura, a maioria dos estudos têm sido realizados utilizando processos aeróbios e, por consequência, pouco foi investigado a respeito da produção anaeróbia. Os principais trabalhos relatados sobre a produção de biossurfactantes por *Bacillus* em anaerobiose encontram-se descritos a seguir, sendo que uma das pesquisas pioneiras no assunto foi desenvolvida em 1985.

Javaheri et al. (1985) estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* JF-2 cultivados sob condições aeróbia e anaeróbia estrita. Os resultados mostraram que em condição anaeróbia, esse microrganismo produz um biossurfactante que reduz a tensão superficial para valores inferiores a 28 mN.m^{-1} . Em estudos de campo realizados por McInerney et al. (1985) sobre *B. licheniformis* JF-2, foi demonstrado que esta cepa pode crescer e produzir biossurfactantes ao longo do reservatório de óleo, e aumentar a recuperação de óleo em 13 %. Este microrganismo posteriormente foi re-identificado como *B. mojavensis* por Folmsbee et al. (2006).

Bacillus licheniformis BAS50 foi capaz de crescer e produzir biossurfactante em anaerobiose utilizando uma variedade de substratos e salinidade de até 13 % de NaCl. O biossurfactante denominado lichenisina A, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água para valores de 28 mN.m^{-1} , e atingiu uma CMC de 12 mg.L^{-1} (YAKIMOV et al., 1995). Em outro estudo realizado por Yakimov et al. (1997), os isolados de *Bacillus licheniformis* BNP29, BNP36, BAS50 e Mep132 cresceram em anaerobiose em temperaturas de até $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e salinidades de 12 % NaCl. A produção de biossurfactante variou de 8 a 50 mg.L^{-1} , quando os cultivos foram conduzidos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 7 % NaCl.

Davis, Lynch e Varley (1999) estudaram a influência das limitações da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio na produtividade da surfactina em condição aeróbia e, em condição limitada de oxigênio por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *B. subtilis* foi capaz de crescer e produzir biossurfactante em todas as condições avaliadas, no entanto, a máxima concentração (439 mg.L^{-1}) foi encontrada quando nitrogênio foi utilizado como nutriente limitante e o oxigênio foi esgotado durante o processo. A produção de surfactina coincidiu com o período no qual as concentrações de nitrato estavam baixas sendo que, a máxima produção

ocorreu durante o período que o nitrato foi esgotado e o nitrito foi utilizado. Os resultados indicaram que a produção de surfactina foi aumentada na condição na qual o nitrato tornou-se o nutriente limitante. A capacidade de *B. subtilis* ATCC 21332 em produzir surfactina em anaerobiose foi relatada por Zhang et al. (2007), no entanto, a pesquisa ficou restrita a aptidão do microrganismo em produzir ou não o biossurfactante e nenhum dado a respeito da produção foi obtido.

O crescimento celular e a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LBBMA155 em condição anaeróbia foram influenciados pelas fontes de carbono e nitrogênio adicionadas ao meio de cultivo. O microrganismo foi capaz de crescer e produzir biossurfactante utilizando glicose e sacarose como fonte de carbono. No entanto, amido e piruvato de sódio demonstraram não ser capazes de sustentar o crescimento celular. *B. subtilis* LBBMA155, havendo preferência por sacarose em detrimento à glicose e a maior produção de biossurfactante foi observada quando, ao meio mineral, foi adicionado sacarose e proteose peptona, ambos a 30 g.L^{-1} , como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (FERNANDES, 2007). O autor observou menor produção de biossurfactante por *B. subtilis* LBBMA 155 na presença de glicose (30 g.L^{-1}) quando o meio mineral foi suplementado com extrato de levedura a $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, em comparação com a produção obtida com o meio mineral suplementado com igual concentração de glicose e maior concentração de extrato de levedura (1 g.L^{-1}).

A produção de biossurfactante em condição anaeróbia também foi verificada por Dastgheib et al. (2008), cultivando *B. licheniformis* ACO1 em meio definido contendo 20 g.L^{-1} de extrato de levedura, como fonte de carbono e 2 g.L^{-1} de NaNO_3 como fonte de nitrogênio. O microrganismo produziu biossurfactante em condição aeróbia e anaeróbia, porém a maior produção avaliada por meio da capacidade de emulsificação foi observada no cultivo aeróbio. *B. licheniformis* ACO1 foi isolado de um poço de petróleo localizado no Irã e apresentou crescimento celular em temperaturas de até $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e salinidade de 180 g.L^{-1} de NaCl .

Gogotov e Miroshnikov (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl no meio de cultivo sobre a produção de biossurfactante por *B. licheniformis* VKM B-511, em condição anaeróbia. Concentrações de 0 a 90 g.L^{-1} de NaCl foram adicionadas no meio de cultura que continha 5 mL.L^{-1} de querosene, como a única fonte

de carbono. Os autores observaram que maiores produções de biossurfactante estavam relacionadas a maiores concentrações salinas no meio de cultivo. Com 90 g.L^{-1} de NaCl obteve-se a maior produção de biossurfactante, $1,17 \text{ g.L}^{-1}$, o maior crescimento celular, além do maior índice de emulsificação, 44,5 %.

Gudiña et al. (2012) selecionaram 7 cepas e estas foram avaliadas através do crescimento celular e da capacidade de produzir biossurfactante em condição aeróbia e anaeróbia. Das 7 cepas 5 foram capazes de produzir biossurfactante em anaerobiose, reduzindo as tensões superficiais do meio para valores entre 31 e 36 mN.m^{-1} . As 5 cepas foram classificadas como *Bacillus subtilis* e testadas em 3 diferentes meios de cultivo. O meio composto por 10 g.L^{-1} de sacarose, como fonte de carbono, e 2 g.L^{-1} de NH_4NO_3 , como fonte de nitrogênio, foi o que apresentou os melhores resultados frente à diminuição da tensão superficial.

Em estudo de campo, Youssef et al. (2013) relataram a inoculação de dois poços de produção com 60 m^3 de água salina juntamente com uma mistura de nutrientes contendo glicose, nitrato de sódio e metais traço, além de *B. licheniformis* RS-1 e *B. subtilis* subsp. *subtilis spizizenii* NRRL B-23049. Os resultados da água de produção indicaram crescimento *in situ* das cepas injetadas e, também, de outras bactérias heterotróficas fermentativas, consumo dos nutrientes e produção de 28 mg de biossurfactante. L^{-1} . O volume de petróleo adicional produzido a partir de um dos poços inoculados após a estimulação microbiana foi de $52,5 \text{ m}^3$, em um período de 60 dias. Os autores relataram que os custos dos nutrientes injetados nos poços para cada barril de petróleo adicional extraído, foi cerca de US\$ 12,89 enquanto que o preço do barril de petróleo é de US\$ 99,89. Os resultados obtidos no estudo mostraram viabilidade técnica e econômica da recuperação de petróleo mediada por biossurfactantes.

Recentemente, Willenbacher et al. (2015) cultivaram *B. subtilis* DSM 10^T para a produção de surfactina em biorreator estritamente anaeróbio em meio definido contendo concentrações iniciais de 2,5 a 10 g.L^{-1} de glicose. O experimento contendo $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose foi o que apresentou os maiores fatores de conversão de substrato em produto (33 mg.g^{-1}) e em células ($0,12 \text{ g.g}^{-1}$) e, portanto, foi considerado o mais eficiente. De acordo com o autor a produção anaeróbia de surfactina já foi demonstrada, porém, cálculos cinéticos referentes à produção do

produto e consumo de substrato nunca foram realizados, sendo este o primeiro trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* ATCC 21332. A escolha do microrganismo foi baseada em dados da literatura que relatam que *B. subtilis* ATCC 21332 é um bom produtor de biossurfactante em condição aeróbia, alcançando produções de biossurfactante próximas a 500 mg.L⁻¹ (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; COUTTE et al., 2010), como também é capaz de produzir em condição anaeróbia (ZHANG et al., 2007).

3.2 Obtenção da cultura estoque de *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Bacillus subtilis ATCC 21332 foi adquirido da American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). A cultura liofilizada foi ressuspensa em um frasco *erlenmeyer* de 20 mL contendo 6 mL de meio NB (Nutrient Broth), composto por peptona (5,0 g.L⁻¹) e extrato de carne (3,0 g.L⁻¹). O frasco contendo a cultura foi incubado em agitador orbital (Quimis, Q816M20) a 30 °C sob agitação de 150 rpm, durante 24 h. Após incubação, 0,5 mL do meio cultivado foi transferido de forma asséptica para tubos criogênicos de 2 mL adicionados de 0,5 mL de glicerol, formando uma suspensão celular em glicerol. Os tubos contendo a cultura de *B. subtilis* ATCC 21332 foram congelados a -80 °C.

Para a obtenção da cultura estoque, um tubo criogênico contendo 1 mL da suspensão celular em glicerol, obtida na etapa anterior, foi descongelado e o volume 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. Transcorridas 24 h, a suspensão de bactérias foi transferida para tubos criogênicos contendo glicerol como descrito anteriormente. A suspensão celular em glicerol foi denominada cultura estoque, sendo estocada a -80 °C.

3.3 Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e a composição salina deste foi baseada na composição da água do mar fornecida pela Petrobras, com modificações. As alterações realizadas no meio de cultivo foram baseadas no meio de cultura descrito por Clark, Munnecke e Jenneman (1981).

O meio de cultivo denominado meio mineral (MM) apresentou a seguinte composição final (em g.L⁻¹): NaCl 24,86; K₂HPO₄ 13,9; Na₂SO₄ 4,41; KH₂PO₄ 2,70; NH₄Cl 2,67; KCl 0,82; MgCl₂.6H₂O 0,42; NaHCO₃ 0,20; KBr 0,07; SrCl₂.6H₂O 0,03; KI 0,013; extrato de levedura 1,0; e elementos traço 10 mL.L⁻¹. A solução de elementos traço tem a seguinte composição (em g.L⁻¹) EDTA 1,0; FeSO₄.7 H₂O 0,1; CaCl₂.2H₂O 0,1; ZnSO₄.H₂O 0,1; CuSO₄.5H₂O 0,01; H₃BO₃ 0,01 e MnSO₄.H₂O 0,0007.

Em alguns ensaios o meio MM foi suplementado como descrito abaixo

- MM1 (meio mineral adicionado de micronutrientes): Composto pelo meio MM, adicionado de 10 mL.L⁻¹ da solução de elementos traço suplementada dos seguintes micronutrientes (em g.L⁻¹) MnSO₄.H₂O 3,0; CoCl₂.6H₂O 0,1; Na₂MoO₄.2H₂O 0,01 e AlK(SO₄)₂.12H₂O 0,01 (CLARK; MUNNECKE; JENNEMAN, 1981).

- MM2 (meio mineral suplementado com extrato de levedura): Composto pelo meio MM1 suplementado com 1,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

As concentrações das fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (NaNO₃) variaram de acordo com cada etapa do trabalho e estão descritas nas sessões seguintes.

3.4 Condições de cultivo

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

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 em agitador orbital, objetivando o estabelecimento do tempo de incubação dos inóculos para posterior utilização nos ensaios em biorreator.

No preparo do pré-inóculo, foram utilizados 2 frascos *erlenmeyer* aletados de 500 mL contendo 150 mL de meio NB, sendo que a cada um foi transferido 1 mL da cultura estoque (armazenada a -80 °C). Estes frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C sob agitação de 150 rpm, durante 24 h, em condição de aerobiose. Transcorridas 24 h, uma alíquota de cada *erlenmeyer* foi retirada para a leitura da densidade óptica por absorbância a 600 nm.

Na etapa seguinte, a amostra que apresentou a maior absorbância foi utilizada em uma proporção de 10 % (v/v) como inóculo para frascos *erlenmeyer* de 50 mL, contendo 25 mL de meio MM (item 3.3), adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃. Os frascos foram incubados em agitador orbital em 150 rpm, à temperatura de 30 °C, por 72 h. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado em 7,0 pela adição de NaOH (3 M).

A amostragem foi realizada pela estratégia de frascos de sacrifício, sendo que em intervalos de 6 h de cultivo um frasco era retirado para análise de biomassa.

3.4.2 Cultivos em biorreator descontínuo

O pré-inóculo foi preparado partindo-se de 1 mL da cultura estoque (armazenada a -80 °C), em frasco *erlenmeyer* de 500 mL contendo 150 mL de meio NB e cultivado sob 30 °C a 150 rpm durante 24 h. Em seguida, 50 mL dessa cultura foi transferida para *erlenmeyer* de 1000 mL, contendo 500 mL de meio MM (adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃), e cultivada sob as mesmas condições por 24 h. Essa cultura foi usada como inóculo e transferida ao biorreator a fim de se ter uma proporção de 10 % do volume final de meio.

Os cultivos foram realizados em biorreator de 7 L (MF114, New Brunswick Scientific Co), com volume útil de 5 L. O biorreator, contendo meio de cultura (descrito no item 3.3), com exceção da glicose, de KH_2PO_4 e de K_2HPO_4 , foi autoclavado, adicionando-se posteriormente as soluções anteriormente mencionadas devidamente esterilizadas, a fim de completarem a constituição do meio.

Os cultivos foram mantidos em 32 °C e o pH ajustado em 7,0 com adição de soluções de NaOH (3 M) ou HCl (1 M). As condições de agitação e aeração foram mantidas em 300 rpm e 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto) para o biorreator aeróbio e 300 rpm para o biorreator anaeróbio. Nos ensaios anaeróbios fez-se a injeção de gás argônio estéril em tempos pré-determinados, com a finalidade de manter o biorreator em anaerobiose.

Amostras de aproximadamente 15 mL foram retiradas em intervalos de tempo variando de 2 a 4 h. Em todos os ensaios 3 alíquotas de 2 mL de amostra do cultivo foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 14000 rpm (cerca de 11000 g) para a determinação da concentração celular. O restante do volume foi transferido para tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugado a 11000 rpm por 15 min a 18 °C, e o centrifugado obtido foi congelado para posterior análise.

3.4.2.1 *Avaliação da produção de surfactina por B. subtilis ATCC 21332 em biorreator aerado e anaeróbio (Etapa 1)*

Inicialmente, avaliou-se a capacidade de produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 sob condição aerada e anaeróbia, utilizando meio MM (descrito no item 3.3) adicionado de 10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃, resultando em uma relação carbono/nitrogênio (C/N) igual a 5,7. O preparo do inóculo, do biorreator e as condições de cultivo como pH, temperatura e agitação estão descritas no item 3.4.2, sendo que os demais ensaios seguiram as mesmas condições.

3.4.2.2 *Influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) na produtividade em surfactina (Etapa 2) em biorreator anaeróbio*

O estudo da variação da relação C/N foi realizado através de ensaios cinéticos utilizando meio MM (descrito no item 3.3), mantendo

constante a concentração de 10 g.L^{-1} de glicose e variando a concentração da fonte de nitrogênio, por meio do aumento na concentração de NaNO_3 , como pode ser observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Concentração de glicose e NaNO_3 utilizada nos ensaios cinéticos com diferentes relações carbono/nitrogênio, em biorreator anaeróbio.

Concentração de glicose (g.L^{-1})	Concentração de NaNO_3 (g.L^{-1})	Relação C/N (gC.gN^{-1})
10	4,85	5,0
10	5,82	4,2
10	6,79	3,6

3.4.2.3 *Influência do aumento nas concentrações de carbono e nitrogênio em diferentes meios de cultivo na produtividade em surfactina (Etapas 3, 4 e 5)*

Avaliou-se a influência do aumento proporcional das fontes de carbono e nitrogênio nos meios MM, MM1 e MM2 sobre o crescimento celular e produtividade em surfactina. Nestes ensaios os meios com composição descrita no item 3.3, foram adicionados de diferentes concentrações de glicose e NaNO_3 , como pode ser visto na Tabela 3.2. A relação C/N empregada nestes ensaios foi a que proporcionou a maior produtividade em surfactina, conforme os resultados dos ensaios mencionados na Tabela 3.1 do item 3.4.2.2.

Tabela 3.2 Concentração das fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (NaNO_3) adicionadas nos meios MM, MM1 e MM2, para os ensaios A, B, C, D, E e F, utilizando biorreator anaeróbio.

Ensaio	Etapas	Meio de cultivo	Concentração de glicose (g.L^{-1})	Concentração de NaNO_3 (g.L^{-1})	Relação C/N (gC.gN^{-1})
A	3	MM	15,0	10,2	3,6
B	3	MM	20,0	13,6	3,6
C	4	MM1	20,0	13,6	3,6
D	4	MM2	20,0	13,6	3,6
E	5	MM2	30,0	20,3	3,6
F	5	MM2	40,0	27,1	3,6

3.4.2.4 Descrição das etapas realizadas nos cultivos em biorreator

Neste item será destacado e resumido todas as etapas realizadas neste trabalho. No conjunto de ensaios realizados em biorreator, buscou-se estudar o comportamento cinético de *B. subtilis* ATCC 21332 em anaerobiose, em termos de crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina. Visando o aumento da produtividade em surfactina foram realizados ensaios variando as concentrações de substratos (glicose e NaNO_3) e os meios de cultivo, sendo que esses ensaios foram divididos em 5 etapas.

Etapa 1 - O objetivo desta etapa foi verificar o potencial de produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio, utilizando meio de cultivo baseado na composição salina da água do mar (meio MM). No entanto, para efeito comparativo realizou-se também um ensaio em biorreator aerado. Os ensaios foram conduzidos em biorreator anaeróbio e aerado em meio MM contendo 10 g.L^{-1} de glicose e $4,25 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 . As etapas seguintes (2, 3, 4 e 5) foram conduzidas em anaerobiose.

Etapa 2 - Nesta etapa buscou-se estudar diferentes relações C/N no meio de cultivo a fim de estabelecer proporções ideais entre as fontes de carbono e nitrogênio que levem a maior produtividade em surfactina. O estudo da influência da relação C/N foi realizado no meio MM mantendo constante a concentração da fonte de carbono (10 g.L^{-1} de glicose) e variando a fonte de nitrogênio, pelo aumento na concentração de NaNO_3 ($4,85$, $5,82$ e $6,79 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3), formando assim relações C/N 5,0, C/N 4,2 e C/N 3,6, respectivamente.

Etapa 3 - Foi verificado na etapa 2 que a maior produtividade em surfactina foi obtida no ensaio relação C/N 3,6, sendo assim, essa relação manteve-se fixa em todos os ensaios subsequentes. Uma vez que a relação C/N foi estabelecida, nesta etapa foram realizados cultivos em meio MM com acréscimos proporcionais das fontes de carbono e nitrogênio avaliando o efeito na produtividade em surfactina. Para tanto, concentrações de 15 e 20 g.L^{-1} de glicose foram testadas.

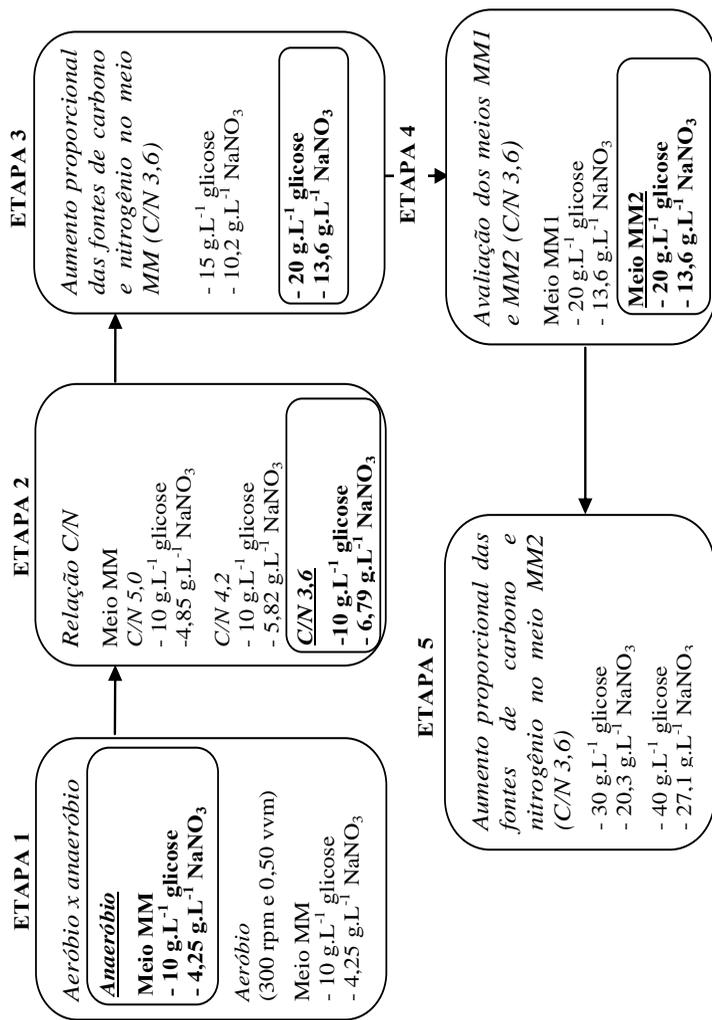
Etapa 4 - Com base nos resultados obtidos no ensaio que continha 20 g.L^{-1} de glicose da etapa 3, buscou-se aprimorar o meio MM através da adição de micronutrientes (meio MM1), além de micronutrientes e suplementação de extrato de levedura (meio MM2). Dessa forma, nesta etapa a mesma condição da etapa 3 foi testada

(20 g.L⁻¹ de glicose e 13,6 g.L⁻¹ de NaNO₃), no entanto, os meios MM1 e MM2 é que foram avaliados sobre o efeito na produtividade em surfactina.

Etapa 5 - Na etapa 4 constatou-se que a maior produtividade em surfactina foi obtida utilizando o meio MM2, logo, este foi empregado para avaliar o aumento proporcional das fontes de carbono e nitrogênio, testando-se concentrações de 30 e 40 g.L⁻¹ de glicose.

Com o objetivo de ilustrar as etapas acima mencionadas construiu-se a Figura 3.1.

Figura 3.1 Representação esquemática dos ensaios cinéticos utilizando diferentes meios de cultivo e concentrações de substratos, para a produção de surfactina.



3.5 Determinações analíticas

3.5.1 Determinação da concentração da biomassa

A concentração celular da biomassa foi realizada por gravimetria, empregando um volume de meio de cultura de 2 mL. Três alíquotas de 2 mL de amostra do cultivo foram transferidas para microtubos de plástico previamente tarados. Os tubos foram centrifugados por 3 min a 14000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para microtubos de plástico e, em seguida, congelado para análises posteriores. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de água destilada e centrifugado novamente, sendo, posteriormente, seco a 90 °C (em estufa) por 24 h. A determinação foi realizada em triplicata.

3.5.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada com a utilização do kit enzimático Glicose PAP Liquiform[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). O kit enzimático é composto pelo Reagente 1 (contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase) e por um Padrão, que contém 1000 mg.L⁻¹ de glicose. A leitura da absorbância das amostras contra o branco (Reagente 1) foi realizada a 505 nm em espectrofotômetro (DR 5000, Hach).

3.5.3 Determinação do nitrato, nitrito e acetato

Antes da realização das análises as amostras foram filtradas em *kit* de filtração da Millipore[®] com membranas de 0,22 µm de diâmetro de poro. A diluição das amostras foi realizada com água Milli-Q[®] (Millipore, USA).

As análises de nitrato, nitrito e acetato foram realizadas em um cromatógrafo de íons (ICS 5000, Dionex), utilizando-se detecção condutivimétrica com supressão eletrolítica. Para separação dos ânions utilizou-se coluna capilar IonPac AS18-Fast (0,4 x 150 mm) e pré-coluna IonPac AG18-Fast (0,4 x 35 mm), ambas da marca Dionex.

3.5.4 Determinação do íon amônio

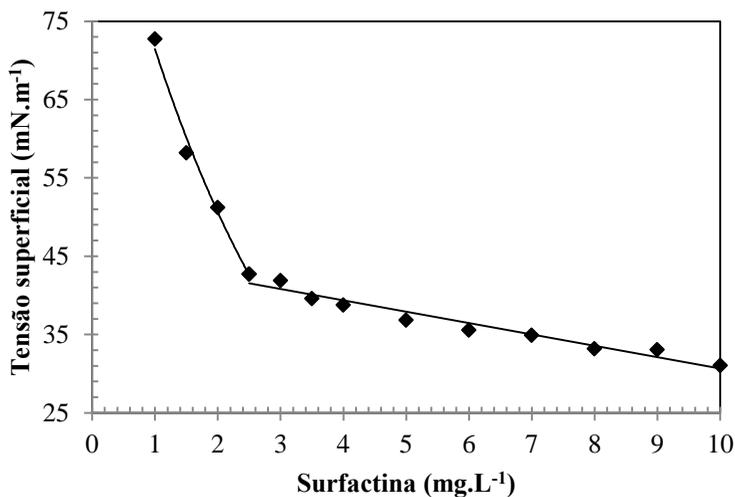
A concentração do nitrogênio amoniacal foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Vogel (1981), utilizando o reagente de Nessler. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em 525 nm. A concentração do nitrogênio foi calculada a partir de uma curva padrão, construída com soluções diluídas de uma solução de NH_4Cl .

3.5.5 Determinação da concentração de surfactina

A determinação da concentração de surfactina presente nas amostras foi realizada utilizando uma curva padrão, a qual foi empregada como um método indireto que faz uso de medidas de tensão superficial das amostras diluídas.

A surfactina utilizada para a elaboração da curva padrão foi adquirida da Sigma-Aldrich, com pureza de 98 %, massa molar $1036,34 \text{ g.mol}^{-1}$, produzida a partir de *Bacillus subtilis*. A surfactina (10 mg) foi diluída em 1000 mL de água Milli-Q® (Millipore, USA), formando assim uma solução de 10 mg.L^{-1} . Partindo-se dessa solução, foram obtidas por sucessivas diluições, soluções com concentração variando de 1 a 10 mg.L^{-1} de surfactina, as quais foram submetidas às leituras da tensão superficial adotando-se o método da placa, o qual será descrito com detalhes no item 3.5.6. Dessa forma, obteve-se a curva padrão que relaciona a tensão superficial de surfactina, dada em mN.m^{-1} , com a sua concentração, expressa em mg.L^{-1} , a qual está representada na Figura 3.2. Optou-se por construir a curva nessas concentrações, porque os valores se encontram abaixo da concentração micelar crítica (SEN; SWAMINATHAN, 2005).

Figura 3.2 Curva padrão que relaciona a tensão superficial à concentração de surfactina da marca Sigma[®], com grau de pureza de 98 %.



Os valores da curva padrão da surfactina foram ajustados por uma função exponencial entre as concentrações 1 e 2,5 mg.L⁻¹ e a partir dessa concentração até 10 mg.L⁻¹ os dados foram ajustados por uma relação linear.

Para valores de tensão superficial entre 72,73 e 42,73 mN.m⁻¹ a concentração de surfactina foi calculada pela Equação 3.1 e, a partir desse valor até 31,05 mN.m⁻¹ utilizou-se a Equação 3.2.

$$\gamma = 100,85e^{-0,345C} \quad (3.1)$$

$$R^2 = 0,989$$

$$\gamma = -1,455C + 45,2 \quad (3.2)$$

$$R^2 = 0,953$$

Onde:

γ = tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)

C = concentração de surfactina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

A determinação da concentração indireta de surfactina através da curva padrão também foi relatada por Mano (2008) e Perna (2010), sendo que a curva de surfactina obtida no presente trabalho exibiu perfil semelhante à encontrada por esses autores.

3.5.5.1 Considerações a cerca da concentração de surfactina produzida

Devido a oscilações na velocidade de agitação do agitador orbital utilizado para o preparo do inóculo, os inóculos ao final de 24 h apresentaram concentrações de surfactina distintas e quando transferidos ao biorreator proporcionaram diferentes concentrações iniciais de surfactina. Para tornar os gráficos comparativos optou-se por desconsiderar a concentração inicial de surfactina proveniente do inóculo, iniciando com concentração de surfactina em zero no biorreator. A concentração de surfactina determinada em cada ponto foi subtraída da concentração inicial gerando um delta de produção, sendo esse definido e expresso nos gráficos como concentração de surfactina produzida.

3.5.6 Análise de tensão superficial e interfacial

As medidas de tensão superficial e tensão interfacial contra n-hexadecano foram realizadas utilizando um tensiômetro digital (KSV, Sigma 702, Finlândia), através do método da placa de platina Wilhelmy e do método do anel de platina Du Noüy, respectivamente. Para a determinação da tensão superficial utilizou-se 25 mL de amostra e para a tensão interfacial 15 mL de amostra e um volume equivalente de n-hexadecano. Todas as medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (22 ± 2 °C). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura. A placa e o anel utilizados para a realização das análises de tensão superficial e interfacial seguiram um protocolo de lavagem. A placa foi lavada com água destilada e etanol, e o anel com hexano e acetona e, em seguida,

ambos foram flambados. Esse procedimento foi executado antes de cada análise realizada.

3.5.7 Recuperação do biossurfactante

A recuperação do biossurfactante produzido foi realizada de acordo com o método descrito por Makkar e Cameotra (1997). Ao final do ensaio, o meio de cultivo foi centrifugado (10000 x g, 20 min, 15 °C), para remoção das células. Para recuperação do biossurfactante, o sobrenadante livre de células foi submetido à precipitação ácida pela adição de HCl 6 M até pH 2,0 e, posteriormente, foi mantido sob repouso por aproximadamente 12 h a 4 °C. O precipitado foi coletado por centrifugação (10000 g, 20 min, 4 °C), lavado duas vezes com água ácida (pH 2,0), dissolvido em água Milli-Q® (Millipore, USA), tendo o pH ajustado para 7,0 e então liofilizado. O sólido, denominado biossurfactante bruto, foi ressuscitado com uma mistura de clorofórmio-metanol (65:15) e, em seguida, os solventes foram evaporados em um rota evaporador, sob vácuo a 40°C. O produto obtido nesta etapa, denominado biossurfactante semipurificado, foi pesado e armazenado a -20 °C para posterior caracterização.

3.5.8 Caracterização e estabilidade do biossurfactante

No estudo de caracterização e estabilidade do biossurfactante produzido utilizou-se como amostra o biossurfactante semipurificado, o qual foi recuperado (como descrito no item 3.5.7) de aproximadamente 4,5 L de meio fermentado, obtido no final do ensaio D. Este cultivo foi realizado utilizando meio MM2 (20 g.L⁻¹ de glicose e 13,6 g.L⁻¹ de NaNO₃), definido na etapa 4 do item 3.4.2.3, como sendo o melhor meio para a produção de surfactina. Nesse estudo o biossurfactante semipurificado foi diluído em água ultra-pura pH 8,0 (Milli-Q, Millipore, USA), à temperatura ambiente, a fim de formar uma solução de 1 g.L⁻¹, com exceção da análise de espectroscopia de infravermelho (item 3.5.8.1) a qual foi conduzida com a amostra sólida.

3.5.8.1 *Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

A caracterização estrutural do bioproduto obtido foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando espectrômetro modelo IRPrestige-21, da marca Shimadzu. Para a análise uma pequena amostra do bioproduto seco foi misturada a brometo de potássio (KBr), macerada e prensada na forma de pastilha. O espectro FTIR foi gerado a partir de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (ISMAIL et al., 2013). Para possíveis comparações, o mesmo procedimento foi realizado para a surfactina padrão (Sigma-Aldrich).

3.5.8.2 *Determinação da concentração micelar crítica (CMC)*

A determinação da CMC foi realizada a partir da medida da tensão superficial (descrito no item 3.5.6) de diluições seriadas de uma solução de 1 g.L^{-1} do biossurfactante semipurificado de acordo com Sheppard e Mulligan (1987). Colocando-se em um gráfico os valores de tensão superficial *versus* a concentração de biossurfactante semipurificado, o ponto onde a concentração de biossurfactante foi incapaz de provocar redução da tensão superficial correspondeu a CMC (DE FARIA et al., 2011).

3.5.8.3 *Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão*

A capacidade emulsificante foi avaliada segundo o método descrito por Iqbal et al. (1995). A um tubo de fundo chato, adicionaram-se 2 mL de uma solução de 1 g.L^{-1} de biossurfactante semipurificado e 2 mL de hidrocarboneto (óleo diesel, n-hexano, n-hexadecano, gasolina e isoctano). O tubo foi homogeneizado em agitador tipo vortex durante 2 min, permanecendo em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (IE_{24}) foi calculado dividindo a altura da camada emulsificada (H_{CE}) pela altura total da coluna (H_T) e multiplicando por 100, de acordo com a Equação 3.3.

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{CE}}{H_T} \cdot 100 \quad (3.3)$$

A estabilidade da emulsão (EE) foi avaliada em intervalos de tempo até 96 h. A EE (%) corresponde à relação entre o índice de emulsificação no tempo t e o índice de emulsificação após uma hora, t_0 . Uma vez que o tempo de uma hora é insuficiente para a estabilização de uma emulsão (FELIX, 2012), considerou-se como t_0 o índice de emulsificação em 24 h.

Uma solução de 1 g.L^{-1} de dodecil sulfato de sódio (SDS), um dos surfactantes sintéticos mais conhecidos, foi preparada e teve sua capacidade emulsificante determinada como descrito acima, para possíveis comparações (DE FARIA et al., 2011).

3.5.8.4 Avaliação da estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada por medidas da tensão superficial (TS) (descrito no item 3.5.6) da solução a 1 g.L^{-1} de biossurfactante semipurificado (obtido como descrito no item 3.5.7) e a solução na diluição micelar crítica (DMC^{-2}), de acordo com Barros, Quadros e Pastore (2008). A solução de 1 g.L^{-1} do biossurfactante foi diluída 100 vezes em água destilada, e esta denominada de diluição micelar crítica (DMC^{-2}). Foram realizadas três medidas para cada amostra.

3.5.8.4.1 Estudo da estabilidade térmica

A solução de biossurfactante semipurificado a 1 g.L^{-1} e a solução na DMC^{-2} foram colocadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e submetidos a tratamento térmico em banho de água a 100°C por períodos de 0, 20, 40, 60, 100 e 140 min. Após o aquecimento, as soluções foram resfriadas até temperatura ambiente e as medidas de TS foram realizadas.

3.5.8.4.2 *Estudo da estabilidade frente a variações da força iônica*

O efeito da salinidade na estabilidade do biossurfactante foi realizado adicionando-se 2,5, 5, 10 e 20 % (p/v) de NaCl na solução de 1 g.L⁻¹ de biossurfactante semipurificado e na solução na DMC⁻². As amostras permaneceram por 30 min em banho de água a 25 °C e em seguida, a TS foi medida.

3.5.8.4.3 *Estudo da estabilidade frente a variações de pH*

A solução de biossurfactante semipurificado a 1 g.L⁻¹ e a solução na DMC⁻² tiveram seus valores de pH ajustados para 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 13 com adição de HCl (0,1 e 1 mol.L⁻¹) e NaOH (0,1 e 1 mol.L⁻¹). O efeito do pH foi avaliado por medidas da TS, após as amostras permanecerem em banho de água a 25 °C por 30 min.

3.6 Tratamento dos dados

3.6.1 Ajuste dos dados

A análise cinética dos resultados experimentais foi realizada pelos ajustes polinomiais dos dados experimentais de biomassa, surfactina, glicose, nitrato, nitrito e acetato *versus* o tempo, pelo *software Microsoft Office Excel 2007* e está representada nos gráficos por meio de uma linha contínua. A partir da derivação dos polinômios, determinaram-se as velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina.

3.6.1.1 *Velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina*

A partir dos perfis de concentração celular, consumo de substrato e formação de produto (ajustes polinomiais feitos com o auxílio do *software Microsoft Office Excel 2007*), foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX/dt), consumo de substrato (-dS/dt) e formação do produto (dP/dt). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular (X) no instante *t*, as velocidades específicas de

crescimento celular (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e formação do produto (μ_P) foram obtidas e estão representadas pelas Equações 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente (GADEN, 1955 apud SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (3.4)$$

A fase exponencial de crescimento celular, que corresponde à máxima velocidade específica de crescimento (μ_{\max}), foi definida colocando-se em um gráfico os valores de logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo. No trecho linear determinou-se o coeficiente angular que corresponde ao valor de μ_{\max} .

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \left(\frac{-dS}{dt} \right) \quad (3.5)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \left(\frac{dP}{dt} \right) \quad (3.6)$$

3.6.1.2 Produtividade em células e em surfactina

A produtividade em células foi determinada pela seguinte equação:

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_{mx}} \quad (3.7)$$

Onde:

P_X = produtividade em células ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

X_m = concentração máxima de células no instante t_{mx} (g.L^{-1})

X_0 = concentração inicial de células (g.L^{-1})

t_{mx} = tempo para atingir a concentração máxima em células (h)

A produtividade em surfactina foi determinada pela seguinte equação:

$$P_r = \frac{C_m - C_0}{t_{mp}} \quad (3.8)$$

Onde:

P_r = produtividade em surfactina ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

C_m = concentração máxima de surfactina no instante t_{mp}
(mg.L^{-1})

C_0 = concentração de surfactina no instante inicial (mg.L^{-1})

t_{mp} = tempo para atingir a concentração máxima em surfactina
(h)

3.6.1.3 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi calculado por meio do coeficiente angular da reta obtida, relacionando-se a concentração celular (g.L^{-1}) em função da concentração de substrato (g.L^{-1}) observadas ao longo do tempo.

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado pela seguinte equação.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3.9)$$

Onde:

P = concentração de surfactina em um instante de tempo t
(mg.L^{-1})

P_0 = concentração inicial de surfactina (mg.L^{-1})

S_0 = concentração inicial de substrato (g.L^{-1})

S = concentração de substrato que corresponde ao instante de tempo t (g.L^{-1})

O fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET/C-GLIC}$) foi calculado pela seguinte equação.

$$Y_{C-ACET/C-GLIC} = \frac{C_{ACET} - C_{ACET_0}}{C_{GLIC_0} - C_{GLIC}} \quad (3.10)$$

Onde:

C_{ACET} = concentração final de carbono do acetato ($g.L^{-1}$)

C_{ACET_0} = concentração inicial de carbono do acetato ($g.L^{-1}$)

C_{GLI_0} = concentração inicial de carbono da glicose ($g.L^{-1}$)

C_{GLI} = concentração final de carbono da glicose ($g.L^{-1}$)

3.6.2 Análise estatística

As médias, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5 % de significância) dos dados foram obtidos com o *software* STATISTICA versão 7.0 (Statsoft Inc., 2001).

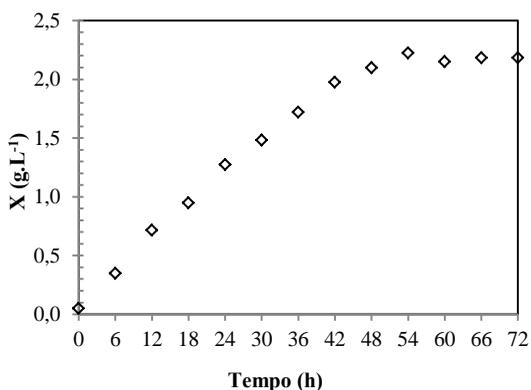
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Com o objetivo de estabelecer o tempo de incubação do inóculo para posterior utilização nos ensaios em biorreator, realizou-se o estudo cinético do crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 em agitador orbital utilizando meio MM adicionado de glicose (10 g.L^{-1}) e NaNO_3 ($4,25 \text{ g.L}^{-1}$).

A curva de crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 está apresentada na Figura 4.1.

Figura 4.1 Concentração celular de *B. subtilis* ATCC 21332 em função do tempo em incubador rotativo a 150 rpm e 30 °C.



A concentração de biomassa, expressa em gramas de matéria seca por litro de meio, atingiu um valor máximo de $2,23 \text{ g.L}^{-1}$ em 54 h de cultivo (Figura 4.1). Este valor de concentração celular mostrou-se próximo ao encontrado por Aparna, Srinikethan e Hegde (2012), de $2,49 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 h de cultivo de *B. clausii* 5B em meio definido contendo 10 g.L^{-1} de glicose como fonte de carbono.

Esse cultivo não apresentou fase de adaptação ao meio de cultura, no entanto, também não foi verificado fase de crescimento exponencial. Observa-se na Figura 4.1 que as células apresentaram fase

linear de crescimento linear até 24 h de cultivo, indicando assim que a velocidade de crescimento se manteve constante, porém, a velocidade específica de crescimento decresceu ao longo do tempo.

Uma hipótese é que possa ter ocorrido limitação de oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo. Como o inóculo partiu de um meio rico em nutrientes (NB), provavelmente a cultura se encontrava a elevada velocidade específica de crescimento, resultando em altas velocidades específicas de consumo de oxigênio. Como a transferência de oxigênio dissolvido ocorreu somente através da agitação dos frascos, o suprimento de oxigênio pode ter sido insuficiente.

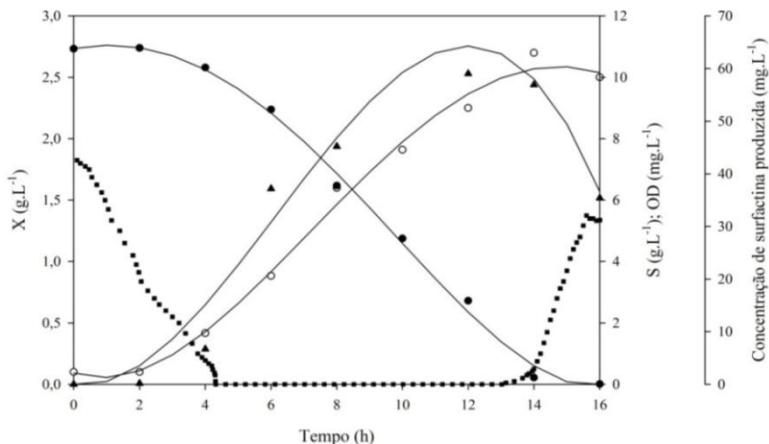
Embora o ideal fosse inocular o biorreator com um inóculo onde as células estivessem em fase exponencial de crescimento, o mesmo não foi possível devido à ausência desta fase. Sendo assim, estabeleceu-se um tempo com as células ainda em fase de crescimento. A partir da curva de crescimento, foi estabelecido um tempo de incubação do inóculo em 24 h, em frascos agitados a 150 rpm e 30 °C.

4.2 Ensaios em biorreator

4.2.1 Avaliação da produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado e anaeróbio (Etapa 1 da Figura 3.1)

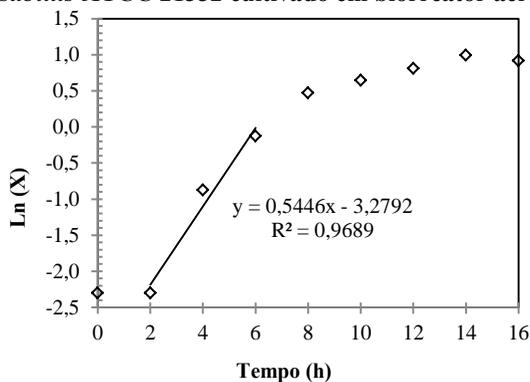
Conforme mencionado no item 3.4.2.1 da Seção Material e Métodos o objetivo desta etapa foi avaliar a produção de surfactina em condição aerada e anaeróbia. Os resultados obtidos para o ensaio em biorreator aerado encontram-se na Figura 4.2.

Figura 4.2 Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)), concentração de oxigênio dissolvido (OD (■)) e concentração de surfactina produzida (▲). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃). A linha contínua representa os ajustes polinomiais.



Para facilitar a discussão dos resultados foi construída a Figura 4.3 onde se encontram os valores do logaritmo neperiano da concentração celular (X) em função do tempo.

Figura 4.3 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 cultivado em biorreator aerado.



Verifica-se que *subtilis* ATCC 21332 apresentou fase de adaptação ao meio de cultivo de 2 h, permaneceu em fase exponencial de crescimento por aproximadamente 4 h, com velocidade específica máxima de crescimento de (μ_{\max}) de $0,544 \text{ h}^{-1}$, e entrou na fase estacionária de crescimento em 14 h de cultivo. A concentração máxima de biomassa foi de $2,70 \text{ g.L}^{-1}$, alcançada em 14 h de cultivo (Figura 4.2). Valores maiores de concentração de biomassa de $4,50 \text{ g.L}^{-1}$ foram relatadas por Kim et al. (1997), cultivando *B. subtilis* C9 para a produção de biossurfactante, em meio mineral composto por 40 g.L^{-1} de glicose, em condição limitada de O_2 . Neste caso, a diferença na maior concentração de biomassa pode ser devido à maior concentração inicial de substrato, uma vez que, a concentração de glicose foi 4 vezes maior que a utilizada no presente estudo.

O crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de glicose durante o ensaio até esta ser exaurida do meio, em 16 h de cultivo. A concentração inicial de OD foi próxima a $7,3 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$ e por volta de 4 h esta concentração atingiu valores muito próximos a zero. Apesar disso, a concentração de biomassa aumentou por mais 10 h de cultivo, comprovando assim, o crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 em limitação de O_2 .

A produtividade em células foi de $0,186 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 14 h mostrando-se ligeiramente superior a $0,173 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 26 h, relatado por Kim et al. (1997). Neste caso, a maior produtividade em células pode estar relacionada à menor fase de adaptação das células (2 h) e maior μ_{\max} ($0,544 \text{ h}^{-1}$) em comparação a estes autores que foi de aproximadamente 5 h e $0,370 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Na Figura 4.2 observa-se que a surfactina começou a ser produzida a partir de 2 h de cultivo, coincidindo com o início do crescimento celular e sua concentração aumentou rapidamente de $6,7 \text{ mg.L}^{-1}$ para $37,2 \text{ mg.L}^{-1}$ entre 4 e 6 h de cultivo, período em que *B. subtilis* ATCC 21332 se encontrava em fase exponencial de crescimento sugerindo, desta forma, que a produção de surfactina está associada ao crescimento celular. Esse comportamento corrobora com outros estudos realizados para produção de surfactina a partir de *B. subtilis* (COOPER et al., 1981; ISMAIL et al., 2013).

A produção de surfactina foi acompanhada pelo crescimento celular ao longo do tempo, sendo que a concentração máxima encontrada foi de $59,1 \text{ mg.L}^{-1}$ em 12 h de cultivo. Davis, Lynch e Varley

(1999) estudaram a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em meio definido contendo 10 g.L⁻¹ de glicose e 4 g.L⁻¹ de NH₄NO₃, em biorreator a 32 °C sob condição aeróbia, com concentração de OD mantido acima de 80 % (em relação a concentração de saturação) e obtiveram produção máxima de 31,2 mg.L⁻¹ após 15 h de cultivo. Comparando-se os dados desses autores com os obtidos neste estudo, nota-se que no presente trabalho houve maior produção de surfactina (59,1 mg.L⁻¹) cultivando o mesmo microrganismo, na mesma temperatura e com a mesma concentração de glicose, no entanto com menor disponibilidade de OD. Como reportado por Kim et al. (1997) maior produção de biossurfactante no cultivo de *B. subtilis* C9, em biorreator, foi observada quando o meio foi limitado em O₂ pela redução da aeração de 1,0 vvm para 0,1 vvm.

Wei et al. (2003) reportaram produção máxima de 250 mg.L⁻¹ de surfactina, cultivando *B. subtilis* ATCC 21332 em meio definido usando 40 g.L⁻¹ de glicose, em agitador orbital. A maior produção de surfactina encontrada por estes autores comparativamente ao presente estudo pode estar relacionada à concentração inicial de glicose no meio, pois de acordo com Kim et al. (1997) a concentração de biossurfactante aumenta quase que linearmente com o aumento da concentração inicial de glicose até 40 g.L⁻¹, sendo que concentrações superiores a essa podem causar pequenas mudanças na produção de biossurfactante. Além disso, a menor produção de surfactina obtida neste ensaio pode também estar relacionada a perdas de biossurfactante na espuma, acarretada tanto pela produção do produto tensoativo quanto pela agitação e aeração do meio. Neste ensaio não foi possível ter um controle na formação de espuma, sendo que uma parcela de volume de líquido do biorreator foi perdida pela espuma formada e, com ela, a surfactina produzida.

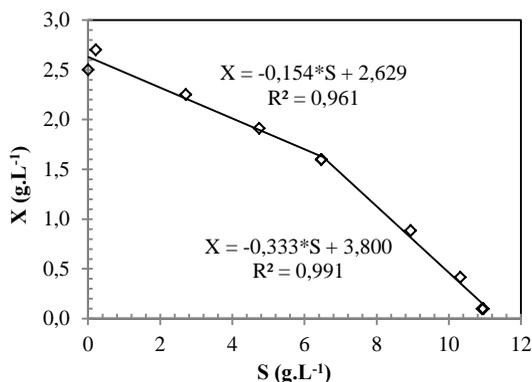
Como visto, as diferenças encontradas nos valores de concentração de surfactina podem estar relacionadas a diversos fatores, de acordo com Desai e Banat (1997) e Makkar e Cameotra (1998), o processo de produção de surfactina é influenciado pelas condições ambientais como pH, temperatura, velocidade de agitação e vazão de aeração, e também pelas concentrações e tipo das fontes de carbono e nitrogênio.

Nota-se ainda na Figura 4.2 que a produção de surfactina cessou após 12 h de cultivo. Entre 14 h e 16 h a concentração diminuiu rapidamente de 56,9 mg.L⁻¹ para 35,4 mg.L⁻¹. Esta redução coincidiu

com o período no qual praticamente não havia mais disponibilidade de glicose e a biomassa entrou em fase estacionária. Comportamento semelhante a este foi observado por outros autores. De acordo com Daud et al. (2006), para cultivos em batelada, quando as células entram na fase estacionária de crescimento e a fonte de carbono está limitada (ou exaurida) o biossurfactante produzido pode ser utilizado como substrato pelos microrganismos. No entanto, segundo Lin et al. (1991), durante a fase estacionária as células produzem enzimas extracelulares que afetam o biossurfactante. Alternativamente, de acordo com estes autores é possível que a inativação do biossurfactante não tenha sido resultado de sua degradação, mas causada pela ligação com outras moléculas, reduzindo assim o seu caráter anfifílico e sua capacidade de reduzir a tensão superficial.

Neste experimento a produtividade máxima em surfactina foi de $4,92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e o fator de conversão de substrato em produto foi de $7,19 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}\cdot\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ em 12 h de cultivo. Davis, Lynch e Varley (1999) estudaram a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em meio definido contendo $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose, em condição aeróbia (OD acima de 80 % da concentração de saturação) e os resultados indicaram produtividade máxima de $2,08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de surfactina em 15 h de cultivo e valor do $Y_{P/S}$ de $3,12 \text{ mg}_{\text{Surfactina}}\cdot\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$. Comparativamente os dados desses autores observa-se que no presente estudo obteve-se melhores resultados de produtividade e $Y_{P/S}$ em um tempo de cultivo menor com condições semelhantes de processo, sugerindo dessa forma um processo mais eficiente. A Figura 4.4 mostra a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, a qual frequentemente permite o cálculo do fator de conversão substrato a células ($Y_{X/S}$).

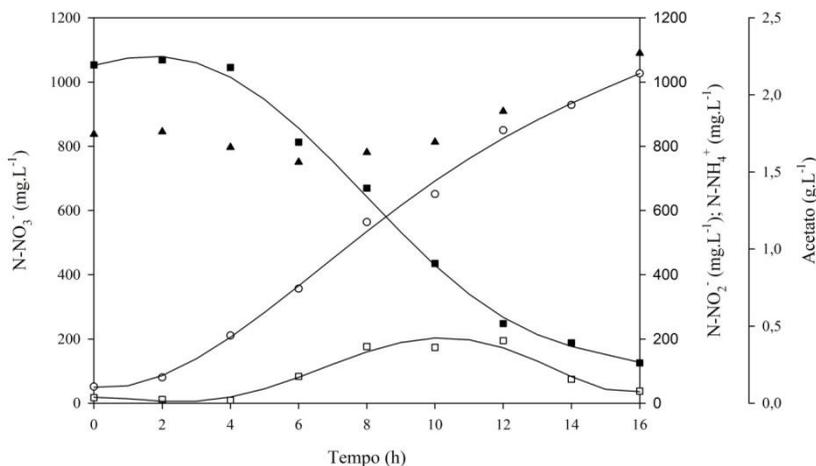
Figura 4.4 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) de *B. subtilis* ATCC 21332.



Observa-se na Figura 4.4 a existência de duas fases distintas de consumo de substrato sugerindo duas etapas de metabolismo. Como é possível observar no primeiro trecho (valores elevados de substrato), o fator de conversão de substrato em células de $0,333 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ foi maior que $0,154 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, correspondente ao segundo trecho do gráfico. Nota-se que o primeiro trecho compreendeu à fase exponencial de crescimento celular (Figura 4.3), ou seja, o crescimento da biomassa foi maior com relação ao consumo de substrato e, em seguida, o crescimento celular tornou-se menos acentuado.

Na Figura 4.5 estão apresentadas as concentrações de N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ e produção de acetato, ao longo do tempo de cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado.

Figura 4.5 Concentração de N-NO_3^- (■), concentração de N-NO_2^- (□), concentração de N-NH_4^+ (▲) e concentração de acetato (○), durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado em meio MM (10 g.L^{-1} de glicose e 4,25 g.L^{-1} de NaNO_3).



Após a concentração de OD do meio alcançar concentrações próximas a zero (Figura 4.2), *B. subtilis* ATCC 21332 passou a utilizar N-NO_3^- como aceptor final de elétrons (Figura 4.5). A concentração de N-NO_3^- foi reduzida de 1045 mg.L^{-1} para 188 mg.L^{-1} no período compreendido entre 4 e 14 h de cultivo. Nesse intervalo de tempo a transferência de O_2 no meio de cultivo não foi suficiente para sustentar o processo aeróbio. Durante esse processo limitado em O_2 , foi observado que tanto O_2 quanto N-NO_3^- foram utilizados como aceptores finais de elétrons, sendo que o O_2 foi utilizado no processo de respiração e o N-NO_3^- através do processo de amonificação anaeróbia do nitrato. De acordo com Ramos et al. (2000), *B. subtilis* cresce na ausência de oxigênio utilizando o processo de amonificação anaeróbia do nitrato, onde este é reduzido pela enzima nitrato redutase até nitrito, o qual é subsequentemente reduzido até amônia pela enzima nitrito redutase. Este processo pode ser confirmado através do aparecimento do N-NO_2^- em 6 h do cultivo, no qual este alcançou concentração máxima de

194 mg.L⁻¹ em 12 h e, em seguida, foi reduzido até 37 mg.L⁻¹. Concomitantemente observa-se que a concentração de N-NH₄⁺ no meio cultivado começou a aumentar, passando de 813 mg.L⁻¹ para 1089 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ (entre 10 e 16 h), sendo que o acréscimo de 276 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ pode ser atribuído ao processo de amonificação anaeróbia do nitrato.

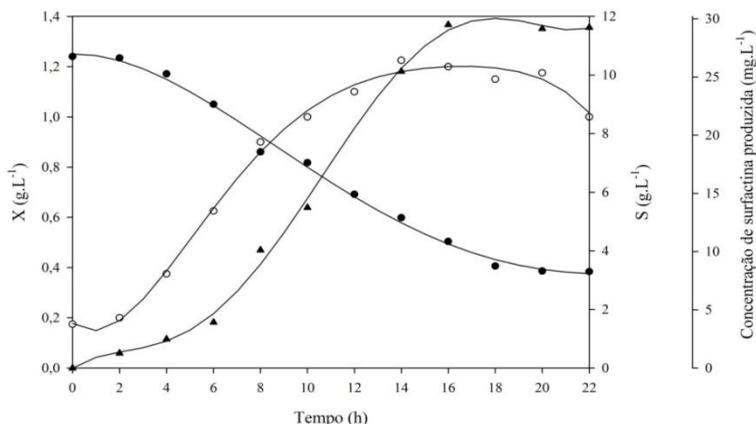
O acetato é um dos principais produtos do consumo da glicose pelo metabolismo de *B. subtilis*. Quando cultivado em excesso de glicose *B. subtilis* metaboliza uma grande quantidade da mesma para gerar piruvato e acetil-CoA e, subsequentemente, converte esses compostos em bioprodutos como acetato, lactato e acetoína (YU et al., 2011). De acordo com Blencke et al. (2003), em excesso de glicose a síntese da enzima que controla a entrada da acetil-CoA no ciclo de Krebs é reprimida, enquanto que os genes das enzimas que convertem acetil-CoA em acetato são induzidos. Yu et al. (2011) verificaram que a produção de acetato foi aumentada quando *B. subtilis* foi cultivado em um meio contendo excesso de glicose e baixa concentração de OD.

Na Figura 4.5 observa-se que a produção de acetato foi acompanhada ao longo do ensaio pelo consumo de glicose, ocorrendo o início dessa produção quando o meio se encontrava com elevada concentração de OD, o que indica que a produção inicial de acetato ocorreu através do metabolismo aeróbio de *B. subtilis* ATCC 21332. A produção máxima de acetato foi de 2,13 g.L⁻¹ e foi alcançada no final do cultivo, resultado do metabolismo aeróbio e anaeróbio de *B. subtilis* ATCC 21332 pelo consumo da glicose.

O fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET/C-GLIC}$) foi calculado como descrito no item 3.6.1.3 e foi de 0,189 g_{C-acetato}·g_{C-glicose}⁻¹. Yu et al. (2011) cultivando *B. subtilis* em meio definido contendo 80 g.L⁻¹ de glicose obtiveram $Y_{C-ACET/C-GLIC}$ de 0,230 g_{C-acetato}·g_{C-glicose}⁻¹. Valor de 0,193 g_{C-acetato}·g_{C-glicose}⁻¹ foi observado por Schilling et al. (2007), no cultivo de *B. subtilis* utilizando meio mineral contendo 5 g.L⁻¹ de glicose. Avaliando esses resultados nota-se ligeira variação nos valores do $Y_{C-ACET/C-GLIC}$, no entanto, o mesmo não parece ter sido influenciado pela concentração inicial da fonte de carbono no meio, uma vez que as concentrações de glicose testadas nos estudos mencionados não foram similares e o valor do $Y_{C-ACET/C-GLIC}$ não seguiu o mesmo comportamento.

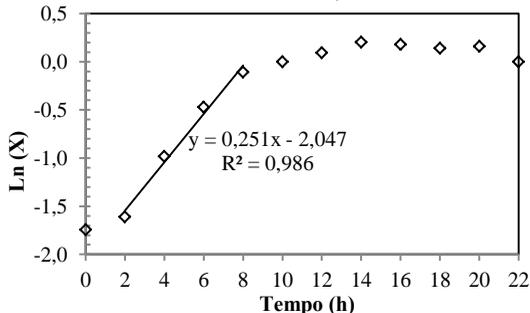
Após o estudo do potencial de produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator aerado, avaliou-se a cinética de crescimento celular e produção de surfactina em biorreator anaeróbio. Na Figura 4.6 estão apresentados os dados relativos ao cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio.

Figura 4.6 Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em condições de anaerobiose em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO₃).



Na Figura 4.7 se encontram os valores do logaritmo neperiano da concentração celular (X) em função do tempo.

Figura 4.7 Representação logarítmica da biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 em cultivo anaeróbio, em biorreator.



Na Figura 4.7 observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 apresentou fase de adaptação ao meio de cultivo de 2 h, permaneceu em fase exponencial de crescimento por aproximadamente 6 h, apresentando um μ_{\max} de $0,251 \text{ h}^{-1}$ e atingiu concentração celular máxima de $1,22 \text{ g.L}^{-1}$ em 14 h de cultivo (Figura 4.6). Comparando-se os valores do crescimento celular de *B. subtilis* ATCC 21332 obtidos neste ensaio (Figura 4.6) com o mostrado anteriormente, para o biorreator aerado (Figura 4.2), nota-se que a mudança na condição de cultivo, quanto ao fornecimento de O_2 , acarretou em menor crescimento celular no cultivo em anaerobiose. Um menor crescimento celular em condição de anaerobiose também foi observado por Yakimov et al. (1995) cultivando *B. licheniformis* BAS50, em meio definido contendo 40 g.L^{-1} de sacarose. Esses autores observaram uma fase de adaptação ao meio de cultivo de aproximadamente 8 h, diferentemente do encontrado neste estudo.

As diferenças nos valores de biomassa, encontrados entre o cultivo aerado e anaeróbico, podem ser explicadas pelo fato de que microrganismos aeróbios extraem maior quantidade de energia de um substrato comparativamente aos anaeróbios. Os processos aeróbios geram de 5 a 20 vezes mais biomassa a partir de uma quantidade determinada de substrato do que os processos anaeróbios (CHERNICHARO, 1997). Observa-se que o crescimento celular foi acompanhado pelo consumo da glicose, sendo que esta deixou de ser consumida em 18 h de cultivo, coincidindo com o momento que as fontes de nitrogênio foram exauridas do meio de cultura (Figura 28).

Pode-se notar que mesmo havendo um residual de glicose no meio, em torno de $3,3 \text{ g.L}^{-1}$, na ausência de aceptores finais de elétrons como, por exemplo, NO_3^- e NO_2^- (Figura 4.8), *B. subtilis* ATCC 21332 foi incapaz de crescer anaerobicamente pela fermentação desse substrato. Comportamento semelhante foi observado por Nakano et al. (1997) cultivando *B. subtilis* em meio definido composto por 10 g.L^{-1} de glicose. Esses autores propuseram que *B. subtilis* possui uma via de fermentação de glicose ineficiente.

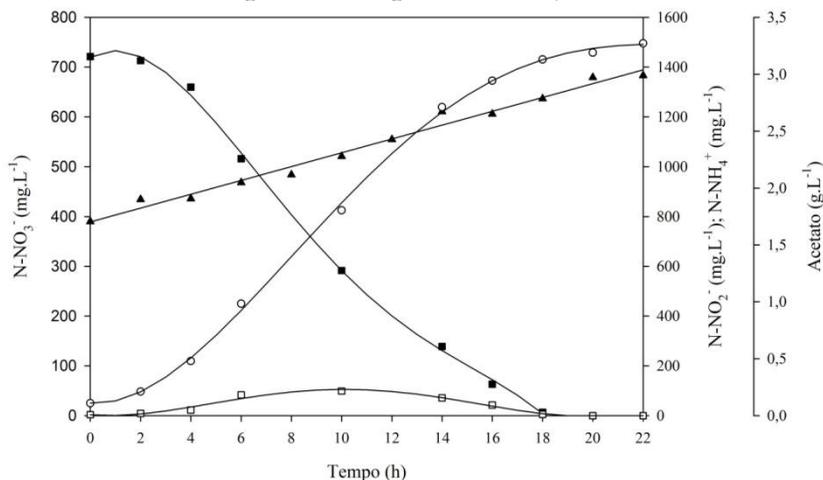
A produção de surfactina foi observada desde o início do cultivo, conquanto a partir de 6 h foi possível notar que a produção aumentou, coincidindo com o final da fase de crescimento exponencial. Observa-se que a produção de surfactina foi acompanhada pelo crescimento celular praticamente durante todo o tempo de cultivo,

indicando que a sua produção esteve associada ao crescimento celular assim como foi observado no cultivo em biorreator aerado.

A concentração máxima de $29,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina foi obtida em 16 h de cultivo, quando *B. subtilis* ATCC 21332 já se encontrava em fase estacionária de crescimento, sendo esta concentração inferior à relatada no ensaio em biorreator aerado, que foi de $59,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina (Figura 4.2). Ao levar em consideração que o inóculo, o meio de cultivo e as condições de cultivo, como temperatura e pH, foram as mesmas entre estes ensaios, a principal diferença reside na questão da existência ou não de transferência de oxigênio, o que levou à maior produção de surfactina. Diferenças nas concentrações de biossurfactante também foram relatadas por Yakimov et al. (1997) em cultivo de *Bacillus licheniformis* BAS50, onde a produção de biossurfactante sob condição aeróbia foi de 3 a 5 vezes maior que a produção sob condição anaeróbia. Esses autores cultivaram 4 cepas de *B. licheniformis* em meio definido contendo 20 g.L^{-1} de sacarose, com objetivo de produzir biossurfactante em anaerobiose para aplicação na MEOR *in situ*. Os resultados mostraram que a produção de biossurfactante entre as cepas variou de 8 a 50 mg.L^{-1} , sendo que *B. licheniformis* cepa BNP29 produziu 35 mg.L^{-1} de biossurfactante, ficando próximo da produção encontrada neste estudo que foi de $29,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Na Figura 4.8 estão apresentadas as concentrações de N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ e produção de acetato, ao longo do tempo de cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio.

Figura 4.8 Concentração de N-NO_3^- (■), concentração de N-NO_2^- (□), concentração de N-NH_4^+ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbio em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 4,25 g.L⁻¹ de NaNO_3).



Verifica-se na Figura 4.8 a redução do N-NO_3^- foi acompanhada pelo consumo da glicose (Figura 4.6) sendo que sua concentração inicial, 721 mg.L⁻¹, foi exaurida do meio em 18 h. Com a redução do N-NO_3^- foi possível notar o aparecimento do N-NO_2^- com concentração máxima de 98 mg.L⁻¹ em 10 h, sendo que entre 10 e 18 h o N-NO_2^- foi totalmente consumido. Observa-se ainda que na medida em que a concentração de N-NO_3^- foi sendo reduzida, a concentração de N-NH_4^+ aumentou, passando de 779 mg.L⁻¹ para 1366 mg.L⁻¹ de N-NH_4^+ , sendo que o acréscimo de 587 mg.L⁻¹ de N-NH_4^+ pode ser atribuído ao processo de amonificação anaeróbia do nitrato. Hoffmann et al. (1998) cultivaram *B. subtilis* JH642 sob condição anaeróbia em meio LB suplementado com 0,18 g.L⁻¹ de glicose e 0,62 g.L⁻¹ de NO_3^- , como acceptor final de elétrons. Os resultados mostraram que *B. subtilis* JH642 converteu quase que completamente o NO_3^- em NO_2^- em 6 h de cultivo e, logo após o aparecimento do nitrito como produto da redução do nitrato, ocorreu sua posterior conversão em NH_4^+ . Nas condições abordadas por esses autores não foi verificado qualquer produto do

processo de desnitrificação como, N_2O ou N_2 e cerca de 65 % da produção do NO_2^- foi convertido a NH_4^+ .

A produção de acetato teve início desde as primeiras horas de cultivo, momento em que a glicose começou a ser consumida, sendo que a produção máxima de $3,27 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 22 h de cultivo e resultou em um $Y_{C-ACET/C-GLIC}$ de $0,440 \text{ g}_{C-acetato} \cdot \text{g}_{C-glicose}^{-1}$. Ao comparar os valores de produção de acetato e do $Y_{C-ACET/C-GLIC}$ em biorreator anaeróbio aos valores em biorreator aerado, que foi de $2,13 \text{ g.L}^{-1}$ de acetato (Figura 4.5) e $0,189 \text{ g}_{C-acetato} \cdot \text{g}_{C-glicose}^{-1}$, respectivamente, percebe-se que em biorreator anaeróbio os valores foram maiores.

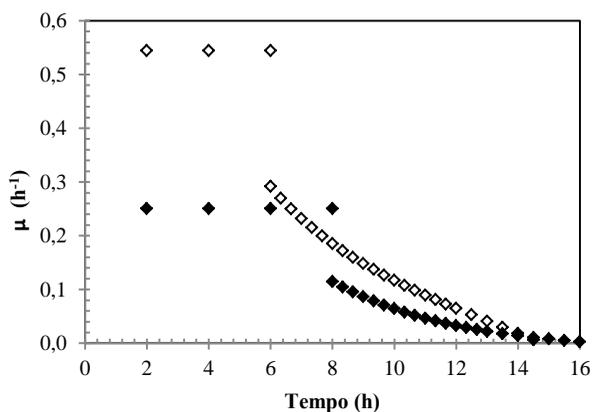
A Tabela 4.1 apresenta uma comparação dos resultados obtidos nos cultivos em anaerobiose e aerobiose.

Tabela 4.1 Resultados obtidos da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), produtividade em células (P_x), produtividade em surfactina (P_r) e fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), entre os ensaios em biorreator anaeróbio e biorreator aerado.

Ensaio	μ_{max} (h^{-1})	P_x ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	P_r ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($mg_{surf} \cdot g_{glic}^{-1}$)
Biorreator anaeróbio	0,251	0,074	1,84	4,67
Biorreator aerado	0,544	0,186	4,92	7,19

A fim de facilitar a comparação, em termos de crescimento celular em aerobiose e anaerobiose, os valores das velocidades específicas de crescimento estão colocados em função do tempo na Figura 4.9. Na construção dessa Figura considerou-se que durante a fase exponencial de crescimento μ_X tem seu valor máximo e constante.

Figura 4.9 Velocidades específicas de crescimento (μ) de *B. subtilis* ATCC 21332 no cultivo em biorreator anaeróbico (\blacklozenge) e em biorreator aerado (\diamond).



Na Figura 4.9, verifica-se que *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator anaeróbico apresentou, na fase exponencial de crescimento, um μ_{\max} ($0,251 \text{ h}^{-1}$) menor que em biorreator aerado ($0,544 \text{ h}^{-1}$). De acordo com Antônio e Reginatto (2007), a velocidade de crescimento dos microrganismos e o rendimento energético dependem do potencial de oxidação dos aceptores finais de elétrons como, por exemplo, O_2 , NO_3^- e SO_4^{2-} , transferidos pela oxidação da glicose. Microrganismos em processos aeróbios dispõem de mais energia para o crescimento celular que em processos anaeróbios. Vale ressaltar que na ausência de aceptores inorgânicos de elétrons ocorre o processo de fermentação da glicose, e esse apresenta um baixo rendimento energético. Dessa forma, no cultivo em anaerobiose onde o O_2 estava ausente e N-NO_3^- foi utilizado como aceptor final de elétrons através do processo anaeróbico de amonificação do nitrato, o menor valor para a velocidade específica máxima de crescimento pode ser justificada.

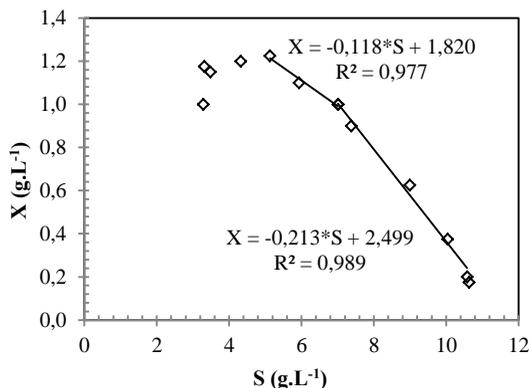
Observa-se na Tabela 4.1 para o ensaio em biorreator anaeróbico que os valores da produtividade em células ($0,074 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e em surfactina ($1,84 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 16 h) foram menores aos encontrados em biorreator aerado que foram de $0,186 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e de $4,92 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 12 h de cultivo, respectivamente. Valores inferiores de produtividade em células e em produto no biorreator anaeróbico já eram esperados, uma

vez que, tanto a concentração celular quanto a produção de surfactina foram menores nessa condição. Willenbacher et al. (2015) estudaram a produção de surfactina por *B. subtilis* DSM 10^T em meio definido contendo 10 g.L⁻¹ de glicose em condição anaeróbia e os resultados indicaram produtividade em surfactina de 1,0 mg.L⁻¹.h⁻¹ em 161 h de cultivo. Comparando-se os dados desses autores com os obtidos neste estudo, nota-se que no presente trabalho obteve-se maior produtividade com a mesma concentração inicial de substrato e um tempo de cinética 10 vezes menor.

O valor do $Y_{P/S}$ no ensaio em biorreator aerado (7,19 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹) foi superior ao obtido em biorreator anaeróbio (4,67 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹). Youssef et al. (2007) testaram a produção de biosurfactante para aplicação na MEOR *in situ* cultivando juntamente *Bacillus* cepa RS-1 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 em condição anaeróbia a 37 °C, utilizando água de formação como meio de cultivo suplementada com 10 g.L⁻¹ de glicose e 1 g.L⁻¹ de NaNO₃ e obtiveram um $Y_{P/S}$ de 11,5 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹, dado superior ao encontrado neste estudo. Pode-se observar uma diferença nesses resultados que pode estar relacionada a diversos fatores tais como temperatura de cultivo, microrganismo produtor e meio de cultivo. No entanto, cabe ressaltar que a água de formação utilizada como meio é fonte de íons, gases dissolvidos e compostos orgânicos como ácidos graxos, podendo estes terem sido utilizados como fonte de carbono.

Na Figura 4.10 encontra-se a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, que resultou em uma relação linear, cujo coeficiente angular permite a determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Figura 4.10 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.



Similarmente ao ensaio em biorreator aerado, neste cultivo (Figura 4.10) também se verificou a presença de duas diferentes fases de consumo de substrato durante o crescimento. No primeiro trecho do gráfico, o fator de conversão de substrato em células foi de $0,213 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ apresentando-se maior que $0,118 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, correspondente ao segundo trecho do gráfico. Comparando-se este ensaio (Figura 4.10) ao ensaio em biorreator aerado (Figura 4.4) observa-se o mesmo comportamento quanto a formação de dois trechos, no entanto, neste ensaio os valores do fator de conversão foram 56,3 % e 30,5 % menores que no aerado, para o primeiro e segundo trecho, respectivamente.

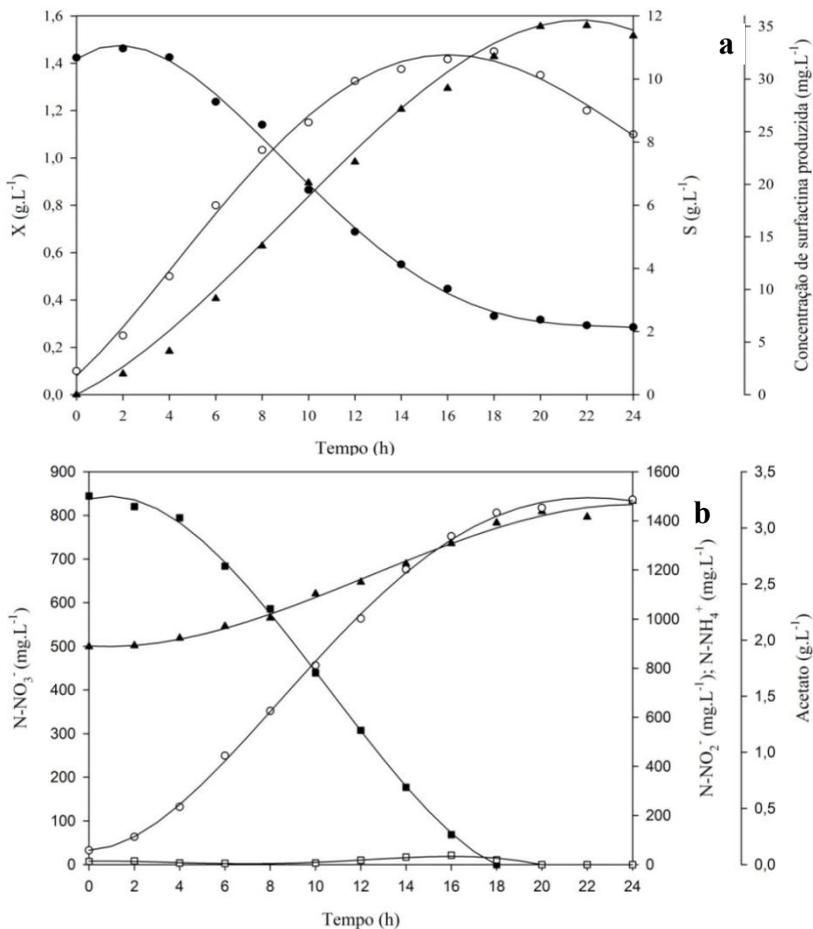
4.2.2 Influência da relação carbono-nitrogênio (C/N) na produtividade em surfactina (Etapa 2 da Figura 3.1)

Conforme mencionado no item 3.4.2.2 da Seção Material e Métodos, nesta etapa estudou-se diferentes relações C/N, a fim de se obter maior produtividade em surfactina.

Na Figura 4.11 (a) estão apresentados os dados de concentração de biomassa, concentração de glicose e concentração de surfactina produzida e na Figura 4.11 (b) estão apresentadas as concentrações de

N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ e produção de acetato, ao longo do tempo de cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio relação C/N 5,0.

Figura 4.11 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (\blacktriangle) e (b) concentração de N-NO_3^- (\blacksquare), concentração de N-NO_2^- (\square), concentração de N-NH_4^+ (\blacktriangle) e concentração de acetato (\circ). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio relação C/N 5,0 em meio MM (10 g.L^{-1} de glicose e $4,85 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3).



B. subtilis ATCC 21332 cresceu nas primeiras horas de cultivo sendo que a concentração celular máxima de $1,45 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 18 h. Nota-se que o aumento da concentração celular até 18 h de cultivo foi acompanhado pelo consumo mais acentuado de glicose. A glicose deixou de ser consumida em 20 h, período que as fontes de nitrogênio foram exauridas do meio de cultura e entre 18 e 20 h a mesma foi consumida por *B. subtilis* ATCC 21332 utilizando N-NO_2^- como aceptor final de elétrons (Figura 4.11 (b)).

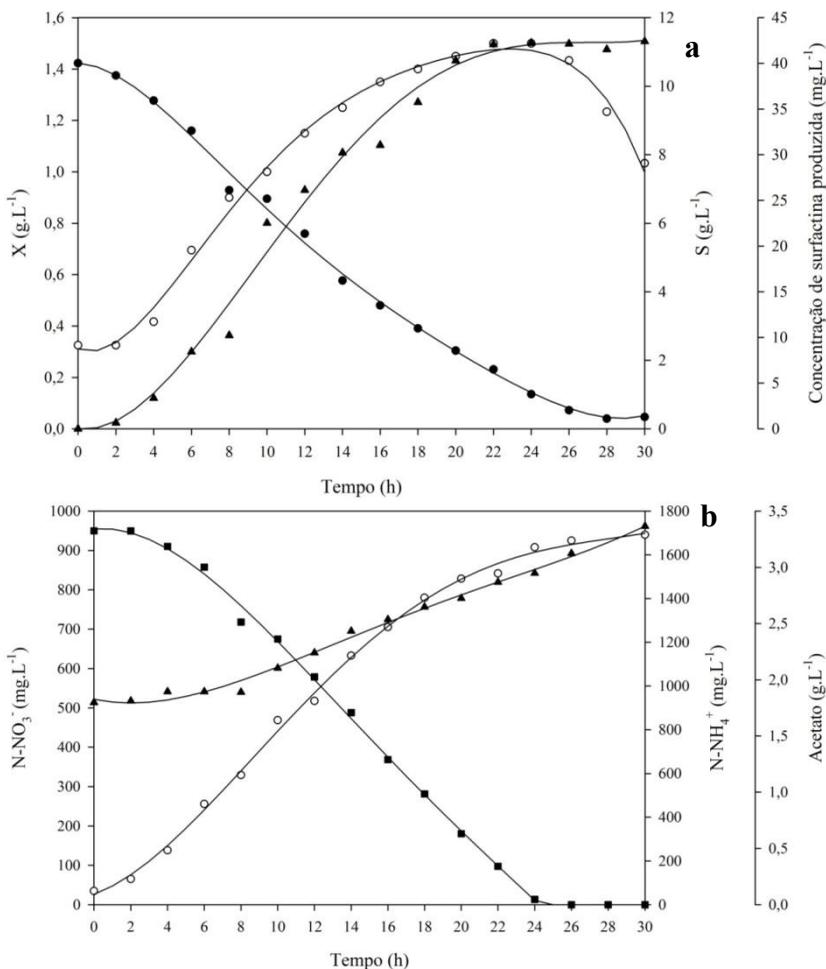
A surfactina começou a ser produzida logo no início do cultivo, coincidindo com o início da fase de crescimento exponencial e foi produzida tanto nesta fase, 9 mg.L^{-1} , no período entre 0 e 6 h de cultivo, quanto na fase estacionária, passando de 27 a 32 mg.L^{-1} entre 14 e 18 h. Nota-se ainda que a surfactina continuou a ser produzida entre 18 e 20 h de cultivo, período que as células já se encontravam em fase de declínio e atingiu concentração máxima de $35,0 \text{ mg.L}^{-1}$ em 20 h de cultivo, mantendo-se praticamente constante até o final do cultivo.

Na Figura 4.11 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 utilizou N-NO_3^- nos instantes iniciais, sendo que a redução do N-NO_3^- foi acompanhada pelo consumo de glicose praticamente durante todo o ensaio. A concentração inicial de 844 mg.L^{-1} de N-NO_3^- foi exaurida do meio em 18 h de cultivo. A concentração máxima de N-NO_2^- de 38 mg.L^{-1} foi alcançada em 16 h e esta foi totalmente consumida entre 16 e 20 h. Como esperado, as concentrações de N-NH_4^+ aumentaram durante o ensaio, pode-se observar um aumento de 888 para 1480 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ no período compreendido entre 0 e 20 h.

O acetato começou a ser produzido no início do cultivo e a partir de 2 h a sua produção foi acompanhada pelo consumo de glicose, até a mesma deixar de ser consumida em aproximadamente 20 h. A produção máxima de $3,25 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 20 h de cultivo, mantendo-se constante até o final do ensaio.

Seguiram-se os ensaios mantendo-se a concentração de glicose constante (10 g.L^{-1}) e aumentando-se a concentração de NaNO_3 no meio de cultivo. Os resultados do ensaio C/N 4,2 estão apresentados na Figura 4.12.

Figura 4.12 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio relação C/N 4,2 em meio MM (10 g.L⁻¹ de glicose e 5,82 g.L⁻¹ de NaNO₃).



Observa-se na Figura 4.12 (a) que o crescimento celular teve início após 2 h de cultivo, apresentando uma ligeira fase de adaptação (também observada na curva do \ln – Figura 4.14 (b)). Pode-se notar que a concentração máxima de biomassa de $1,50 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 22 h, sendo esse valor ligeiramente maior a $1,45 \text{ g.L}^{-1}$, encontrado no ensaio C/N 5,0. Observa-se que o crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de glicose até 26 h, onde a mesma deixou de ser consumida devido à limitação de nitrogênio no meio de cultivo (Figura 4.12 (b)).

A produção de surfactina teve início juntamente com o crescimento celular, ou seja, na fase logarítmica de crescimento (Figura 4.14 (b)) e observa-se ainda que o aumento na formação do produto esteve relacionado ao aumento da biomassa, até a mesma atingir a fase estacionária. A produção máxima de surfactina de $42,1 \text{ mg.L}^{-1}$ foi alcançada em 22 h de cultivo, mostrando-se maior a $35,0 \text{ mg.L}^{-1}$, valor este encontrado no ensaio com a relação C/N 5,0. Diferentemente do ensaio C/N 5,0, neste cultivo *B. subtilis* ATCC 21332 não produziu surfactina na fase estacionária, no entanto, observa-se uma maior produção de surfactina, sugerindo que a produção foi influenciada positivamente pela menor relação C/N.

Pode-se observar nos cultivos C/N 5,0 e C/N 4,2 (Figura 4.11 e Figura 4.12) que a glicose não foi totalmente consumida devido à limitação da fonte de nitrogênio e que no mesmo momento a surfactina deixou de ser produzida. Bence (2011) cultivando *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator, utilizando meio definido composto por 40 g.L^{-1} de glicose observou que a produção de surfactina cessou no momento em que o nitrato foi exaurido do meio, sugerindo que a produção de surfactina é provavelmente limitada pelo esgotamento do nitrato, fato este que foi observado nos ensaios até aqui discutidos. No entanto, no estudo realizado por Davis, Lynch e Varley (1999) observou-se um comportamento contrário quando *B. subtilis* ATCC 21332 foi cultivado em biorreator, com meio contendo 40 g.L^{-1} de glicose sob limitação da fonte de nitrogênio e oxigênio. Os autores observaram que a produção de surfactina aumentou no momento em que o nitrato tornou-se o nutriente limitante e a maior produção foi obtida não durante o período de utilização do nitrato, mas sim após o esgotamento do nitrato e consumo do nitrito. Os resultados indicaram que a produção de

surfactina foi aumentada na condição na qual o nitrato tornou-se o nutriente limitante.

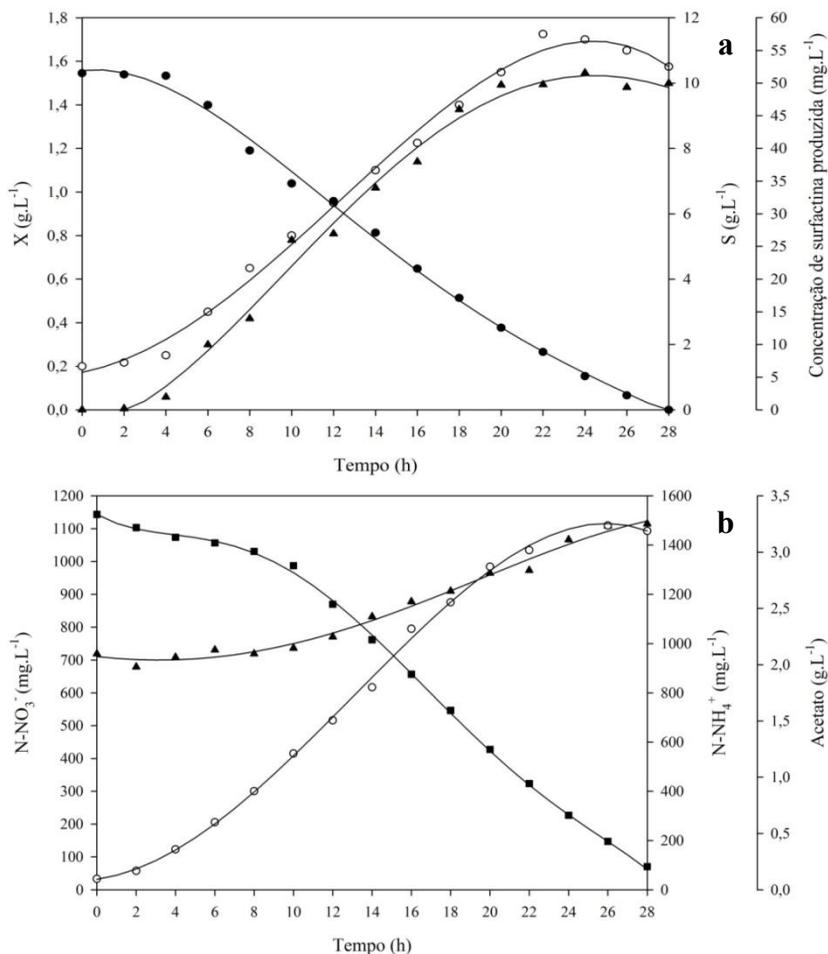
Na Figura 4.12 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 passou a utilizar N-NO_3^- a partir de 2 h de cultivo e a redução do N-NO_3^- foi acompanhada pelo consumo de glicose até próximo as 25 h, momento que o N-NO_3^- foi exaurido do meio. Através da redução de 950 mg.L^{-1} de N-NO_3^- formaram-se 806 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ , sendo que os 144 mg.L^{-1} de N-NO_3^- restantes possivelmente foram utilizados para crescimento celular e produção de surfactina. Ainda sobre a Figura 4.12 (b) é possível verificar uma relação direta entre o consumo de glicose e produção de acetato, onde a concentração máxima de acetato de $3,29 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 26 h de cultivo e, em seguida, manteve-se praticamente constante até 30 h de cultivo.

Com base nos resultados obtidos até esta etapa pode-se observar que com o aumento da fonte de nitrogênio, isto é, com a diminuição da relação C/N, as células cresceram por um período maior e por consequência produziram surfactina por mais tempo. Dessa forma, realizou-se um cultivo com relação ainda menor (C/N 3,6) e os resultados estão apresentados na Figura 4.13.

B. subtilis ATCC 21332 permaneceu por 2 h em fase de adaptação (também observada na curva do Ln –Figura 4.14 (c)), e a concentração máxima em 22 h de cultivo foi de $1,73 \text{ g.L}^{-1}$. Comparando-se os dados do crescimento celular deste ensaio, C/N 3,6, aos dados dos cultivos realizados anteriormente, C/N 5,0, mostrado na Figura 4.11 (a), que foi de $1,45 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e C/N 4,2, mostrado na Figura 4.12 (a), que foi de $1,50 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, observa-se que no ensaio C/N 3,6 o crescimento celular foi maior. Provavelmente esse aumento na concentração de biomassa se deve a diminuição da relação C/N, uma vez que com o aumento da concentração de nitrato no meio, acarretou consumo mais acentuado de glicose. O crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de glicose até 22 h de cultivo, após esse período a glicose continuou sendo consumida e provavelmente foi utilizada por *B. subtilis* ATCC 21332 para a produção de ácidos como, por exemplo, o acetato ou ainda outros produtos do seu metabolismo, pois após 22 h de cultivo não se verificou crescimento celular. Ainda com relação ao consumo de glicose nota-se que ao contrário do que foi verificado nos ensaios C/N 5,0 e C/N 4,2, neste caso toda a glicose foi

consumida, fato este que se deve ao aumento da concentração inicial de nitrogênio no meio de cultivo.

Figura 4.13 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (○)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de $N\text{-NO}_3^-$ (■), concentração de $N\text{-NH}_4^+$ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio relação C/N 3,6 em meio MM ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e $6,79\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).



Na Figura 4.13 (a) nota-se que a surfactina começou a ser sintetizada em 2 h de cultivo e a produção máxima de $49,7 \text{ mg.L}^{-1}$ foi alcançada em 20 h, permanecendo praticamente constante até o final do cultivo. A produção foi acompanhada pelo consumo de glicose entre 2 e 20 h, sendo que a mesma ocorreu praticamente, até as células atingirem a fase estacionária. A produção de $49,7 \text{ mg.L}^{-1}$ foi maior que $35,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $42,1 \text{ mg.L}^{-1}$, encontrado nos ensaios C/N 5,0 e C/N 4,2, respectivamente. Dessa forma, os resultados dos cultivos realizados com diferentes relações C/N mostraram que houve influência da concentração de nitrogênio sobre o comportamento de crescimento celular e de produção de surfactina, indicando que a relação C/N 3,6 foi a que apresentou o melhor resultado tanto para a produção de surfactina quanto para o crescimento celular. Não foram encontrados relatos na literatura sobre o estudo da influência da relação C/N na produção de surfactina ou qualquer outro biosurfactante produzido pelo gênero *Bacillus* em condição anaeróbia, dificultando a comparação e discussão dos resultados obtidos. No entanto, a influência da relação C/N na produção de biosurfactante vem sendo explorada sob condição aeróbia.

Fonseca et al. (2007) estudaram a influência da relação C/N na produção de surfactina em aerobiose no cultivo de *B. subtilis* YRE207 em frascos agitados, utilizando meio definido contendo 10 g.L^{-1} de sacarose, como fonte de carbono e NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio. As relações C/N estudadas por esses autores foram 15, 9 e 3 gC.gN^{-1} e, de acordo com os resultados obtidos na medida que a relação C/N foi reduzida, maiores valores de produção em surfactina e biomassa foram alcançados, sendo que a relação C/N 3,0 foi a que apresentou os melhores resultados. Comportamento semelhante foi relatado por Bence (2011) cultivando *B. subtilis* ATCC 21332 em meio definido contendo glicose como fonte de carbono, sob condição aeróbia em biorreator. Os resultados encontrados por este autor mostraram que a redução da relação C/N no meio de cultivo de 18,6 para 9,0 e, em seguida, para 5,0 gC.gN^{-1} , desempenhou um papel importante tanto na produção de surfactina quando no crescimento celular, e a maior produção em surfactina foi encontrada para a relação C/N 5,0 com meio composto por 40 g.L^{-1} de glicose. Embora o microrganismo e a fonte de carbono tenham sido os mesmos que os utilizados no trabalho realizado por Bence (2011), os resultados cinéticos não podem ser comparados, devido a concentração de glicose utilizada no presente estudo ser 4

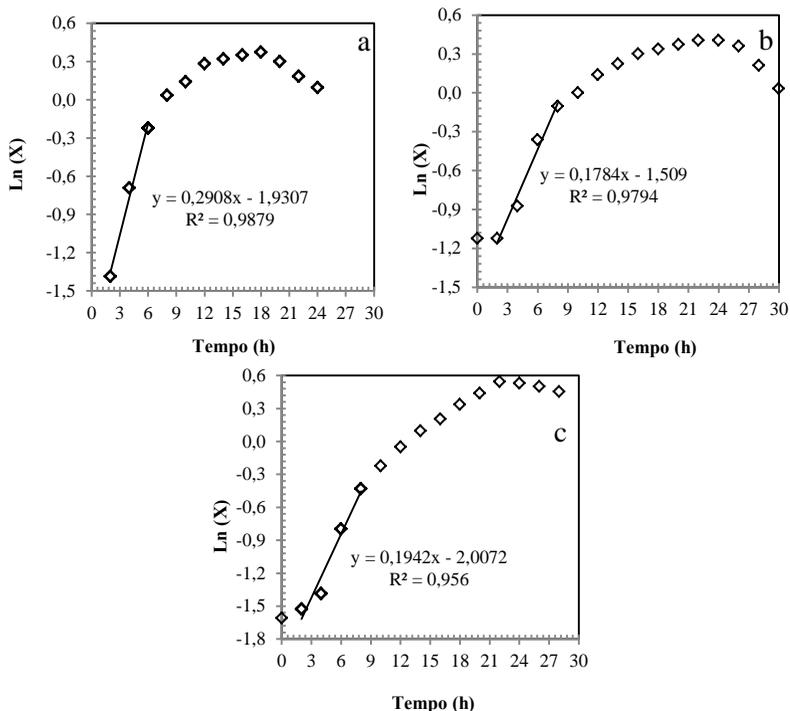
vezes menor a deste autor. No entanto, pode-se observar que em se tratando da influência da redução na relação C/N sobre o aumento da produção de surfactina e de biomassa ambos apresentaram o mesmo comportamento.

A influência da relação C/N é um fator importante sobre a produção de biossurfactantes (DE SOUSA, 2008). De acordo com Santana Filho (2009) não existe um consenso sobre a relação C/N na produção deste produto, podendo depender da cepa e das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas.

Nota-se na Figura 4.13 que $N-NO_3^-$ foi consumido durante todo o cultivo, apresentando um residual no final do ensaio de aproximadamente 70 mg.L^{-1} . Observa-se ainda que na medida em que $N-NO_3^-$ foi reduzido, através do processo de amonificação anaeróbia do nitrato, $N-NH_4^+$ foi sendo formado. A produção de acetato foi verificada praticamente ao longo de todo o cultivo, e a produção máxima de $3,24 \text{ g.L}^{-1}$ alcançada em 26 h de cultivo. Embora haja diferença no consumo de glicose entre os ensaios, a produção de acetato foi muito semelhante ficando na ordem de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$.

A fim de comparar os valores de μ_{\max} entre os cultivos efetuados com as relações C/N 5,0, C/N 4,2 e C/N 3,6, foi construída a Figura 4.14 onde se encontra a representação logarítmica da concentração celular com o tempo de cultivo.

Figura 4.14 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 durante os ensaios utilizando relação C/N 5,0 (a), C/N 4,2 (b) e C/N 3,6 (c).



Verifica-se na Tabela 4.14 que nos 3 ensaios realizados *B. subtilis* ATCC 21332 entrou em fase exponencial de crescimento celular em 2 h de cultivo e manteve-se em μ_{\max} em torno de 4 e 6 h. Observa-se que a tomada de pontos no início do cultivo foi escassa para uma adequada análise do valor de μ_{\max} , pois, uma maior frequência de tomada de amostras permitiria definir melhor o valor de μ_{\max} o que contribuiria para a comparação dos resultados. Dessa forma, calculou-se um valor médio da velocidade específica máxima de crescimento entre os ensaios, o qual correspondeu a $0,220 \text{ h}^{-1}$. O valor de μ_{\max} ($0,220 \text{ h}^{-1}$) encontra-se maior comparativamente àquela relatada por Willenbacher

et al. (2015) que foi de $0,074 \text{ h}^{-1}$ ao estudarem a produção de surfactina por *B. subtilis* DSM 10^T em biorreator anaeróbio, com meio mineral contendo a mesma concentração inicial de substrato deste estudo, 10 g.L^{-1} de glicose.

A Tabela 4.2 apresenta uma comparação dos resultados cinéticos obtidos nos cultivos relação C/N 5,0, C/N 4,2 e C/N 3,6.

Tabela 4.2 Resultados da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET}/C\text{-GLIC}}$), entre os ensaios C/N 5,0, C/N 4,2 e C/N 3,6.

Relação C/N (gC.gN^{-1})	P_r ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($\text{mg}_{\text{surf}}.\text{g}_{\text{glic}}^{-1}$)	P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{C\text{-ACET.C-GLIC}}^{-1}$ ($\text{g}_{C\text{-acet}}.\text{g}_{C\text{-glic}}^{-1}$)
5,0	1,75	4,22	0,075	0,363
4,2	1,91	4,71	0,053	0,312
3,6	2,49	6,38	0,069	0,311

A diminuição da relação C/N influenciou positivamente os resultados cinéticos referentes à produção de surfactina. A produtividade em surfactina (P_r) teve aumento de 42 % quando a relação C/N foi reduzida de 5,0 para 3,6, enquanto que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi o mais influenciado e sofreu aumento 51 %. Bence (2011) observou fato semelhante no estudo da relação C/N para produção de surfactina cultivando *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator. Este autor observou aumento de 27 % no valor de P_r quando C/N foi reduzido de 18,6 para 9,0 e observou aumento ainda maior, 172 %, na redução da relação C/N de 9,0 para 5,0.

Como pode ser observado na Tabela 4.2 houve uma relação diretamente proporcional entre a produtividade em surfactina e o fator de conversão de substrato em surfactina, apontando o ensaio C/N 3,6 com resultados mais satisfatórios. O mesmo não foi verificado para a produtividade em células (P_x), a qual mostrou que o maior valor de P_x foi de $0,075 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, referente ao C/N 5,0. Entretanto, analisando os resultados foi observado que os maiores valores de P_x estavam relacionados aos maiores valores de μ_{max} , como pode ser verificado na Figura 4.14.

A produtividade indica a velocidade de formação do produto, sendo uma referência importante na seleção de um processo a fim de

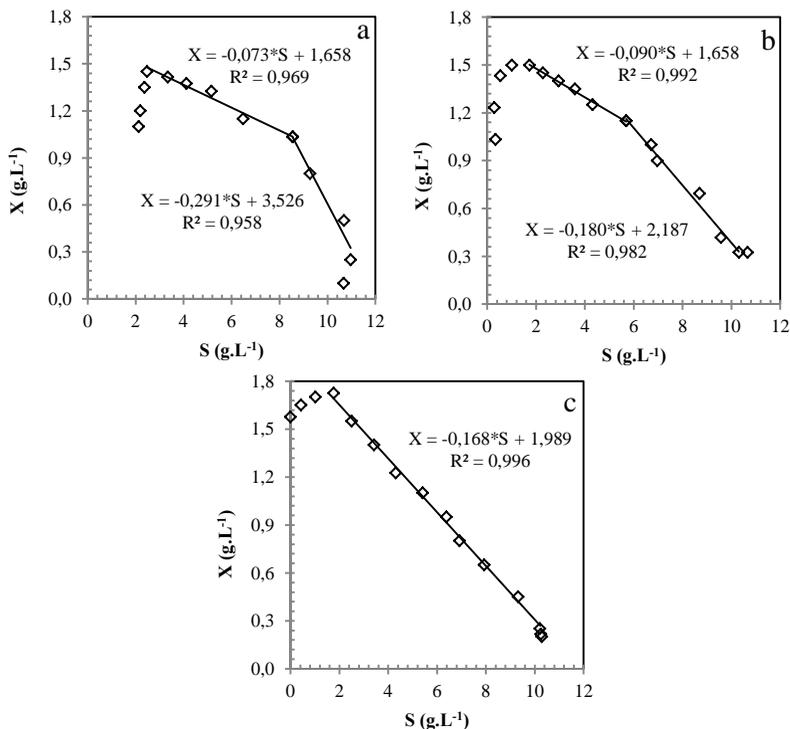
melhorar a economia do mesmo. Neste estudo pode-se perceber que pequenas variações na relação C/N promoveram efeitos importantes na melhoria do processo. O maior valor de P_r de 2,49 $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 20 h de cultivo, encontrado no ensaio C/N 3,6, é coerente com os dados da literatura em processos anaeróbios. Este valor é superior ao valor de P_r de 2,05 $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 22 h de cultivo, relatado por Yakimov et al. (1997) no cultivo anaeróbio de *B. licheniformis* Mep132 em meio definido contendo 20 g.L^{-1} de sacarose como fonte de carbono.

Com relação ao fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{\text{C-ACET.C-GLIC}}^{-1}$), nota-se na Tabela 4.2 que os valores foram muito semelhantes, ficando em torno de 0,33 $\text{g}_{\text{C-acetato}}.\text{g}_{\text{C-glicose}}^{-1}$. Este valor mostra-se superior comparativamente a 0,072 $\text{g}_{\text{C-acetato}}.\text{g}_{\text{C-glicose}}^{-1}$ encontrado por Lin et al. (1991) cultivando *B. licheniformis* JF-2 para produção de biossurfactante, em meio mineral contendo 10 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de NaNO_3 , sob condição anaeróbia. Esses autores observaram que a maior parcela do carbono consumido foi destinada à produção de ácido láctico, a qual forneceu um fator de conversão de C-glicose em C-lactato de 0,377 $\text{g}_{\text{C-lactato}}.\text{g}_{\text{C-glicose}}^{-1}$, além da produção de acetoína e ácido fórmico. De acordo com Ramos et al. (2000) existem vários processos fermentativos durante o metabolismo anaeróbio de *Bacillus*, podendo levar à formação de diferentes ácidos.

Na Figura 4.15 encontra-se a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, que resultou em uma relação linear, cujo coeficiente angular permite a determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Na Figura 4.15 (a) e (b) é possível observar, nas horas iniciais dos cultivos C/N 5,0 e C/N 4,2 maior produção de células com relação ao consumo de substrato. Em seguida, o substrato continua sendo consumido, mas o crescimento celular torna-se menos acentuado. Esse comportamento resultou em maiores valores de $Y_{X/S}$ de 0,291 e 0,180 $\text{g}_{\text{células}}.\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, para o primeiro trecho do gráfico, do que para o segundo trecho do gráfico de 0,073 e 0,090 $\text{g}_{\text{células}}.\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, para C/N 5,0 e C/N 4,2, respectivamente. Diferentemente do comportamento observado nos cultivos C/N 5,0 e C/N 4,2, no ensaio C/N 3,6 foi possível estabelecer uma relação linear entre os dados experimentais de concentração celular e concentração de glicose, sendo que o valor do $Y_{X/S}$ foi de 0,168 $\text{g}_{\text{células}}.\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$.

Figura 4.15 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. (a) relação C/N 5,0, (b) relação C/N 4,2 e (c) relação C/N 3,6.

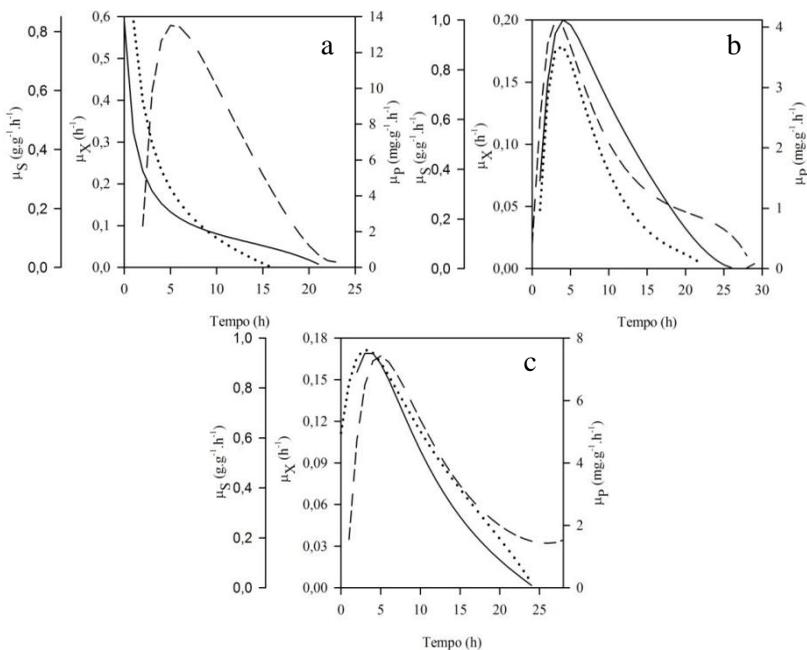


Nota-se que a diferença de comportamento dentre os ensaios pode dificultar a comparação dos valores do $Y_{X/S}$. No entanto, o valor do $Y_{X/S}$ de $0,168 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ (Figura 4.15 (c)) calculado no cultivo C/N 3,6 está de acordo com os dados encontrados na literatura. Este valor ($0,168 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$) mostrou-se comparativamente maior a $0,130 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, relatado por Lin et al. (1991) cultivando *B. licheniformis* JF-2 para a produção do biosurfactante lichenisina A, mostrando-se também superior a $0,049 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, reportado por Willenbacher et al. (2015) cultivando *B. subtilis* DSM 10^T para a produção de surfactina. O valor do $Y_{X/S}$ obtido no presente trabalho é

considerado satisfatório, pois tanto neste estudo quanto nos citados, os cultivos foram conduzidos em anaerobiose com meio definido contendo a 10 g.L^{-1} de glicose.

A Figura 4.16 ilustra o comportamento das velocidades específicas de crescimento ($\mu_X = (1/X)(dX/dt)$), de consumo de substrato ($\mu_S = (1/X)(-dS/dt)$) e de produção de surfactina ($\mu_P = (1/X)(dP/dt)$) para a classificação do produto formado (associado, parcialmente associado ou não associado ao crescimento celular), nos ensaios em biorreator utilizando *B. subtilis* ATCC 21332, variando-se as relações C/N.

Figura 4.16 Gráficos representativos para classificação do produto formado nos ensaios em biorreator utilizando *B. subtilis* ATCC 21332, variando as relações C/N. (a) C/N 5,0, (b) C/N 4,2 e (c) C/N 3,6. (···) μ_X , (—) μ_S , (—) μ_P .



Pode-se observar pela Figura 4.16 (b) e Figura 4.16 (c) que as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato

(μ_s) e de produção de produto (μ_p) apresentaram perfis semelhantes, correlacionando-se bem, podendo-se afirmar que a formação do produto é um metabólito primário e está associado ao crescimento celular. De acordo com Schmidell et al. (2001), esta configuração representa o caso em que o produto formado está diretamente ligado as reações do catabolismo ou decomposição dos substratos, neste caso, a glicose.

Observa-se na Figura 4.16 (a) que o perfil de velocidade de consumo de substrato encontra-se ligeiramente deslocado das demais velocidades. No entanto, há uma semelhança entre as curvas para os perfis de velocidade de crescimento celular e formação do produto e através dessa correlação pode-se dizer que se trata de um metabólito primário, associado ao crescimento celular.

Amani^b et al. (2010) ao estudarem a produção de biossurfactante produzido por *B. subtilis* NLIM 0110, *Pseudomonas aeruginosa* NLIM 0112 e *B. cereus* NLIM 0111 em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono, observaram uma relação entre o consumo de sacarose, crescimento celular e produção de biossurfactante, indicando assim que a produção de biossurfactante esteve associada ao crescimento celular. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, pois de acordo com os resultados apresentados na Figura 4.16, este perfil de metabólito primário foi predominante. Aparna, Srinikethan e Hegde (2012) observaram que a cinética de *B. clausii* 5B indicou uma relação paralela entre a produção de biossurfactante, crescimento celular e utilização de substrato, sugerindo uma produção de biossurfactante associada ao crescimento, quando 10 g.L⁻¹ de glicose foram utilizadas como fonte de carbono. O fato de o produto formado estar ou não associado ao crescimento celular é dependente de diversos fatores, dentre os quais podem ser destacados o tipo de microrganismo a ser utilizado e o meio de cultivo em que o mesmo será cultivado.

De acordo com os resultados de produção e produtividade em surfactina obtidos a partir dos ensaios com diferentes relações C/N, observou-se que a relação C/N 3,6 foi a que apresentou os melhores resultados. Dessa forma, esta relação C/N foi selecionada para os demais ensaios.

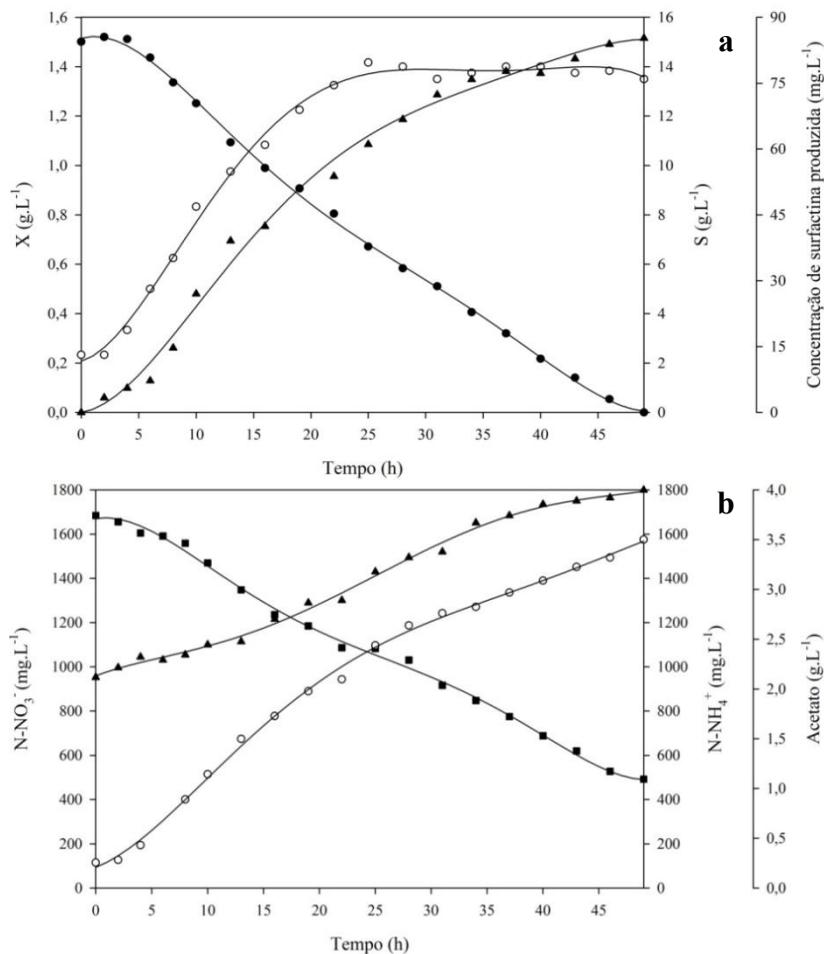
4.2.3 Influência do aumento proporcional nas concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio em diferentes meios de cultivo na produtividade em surfactina (Etapas 3, 4 e 5 da Figura 3.1)

Neste item estudou-se a influência do aumento proporcional nas concentrações das fontes de carbono (glicose) e de nitrogênio (NaNO_3), nos meios MM, MM1 e MM2, com o objetivo de se alcançar maior produtividade em surfactina. Os ensaios foram denominados de A, B, C, D, E e F, conforme descrito no item 3.4.2.3 da Seção Material e Métodos. Os resultados obtidos no ensaio A, com meio MM composto por 15 g.L^{-1} de glicose e $10,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 , encontram-se na Figura 4.17.

Observa-se na Figura 4.17 (a) que *B. subtilis* ATCC 21332 atingiu concentração celular máxima de $1,42 \text{ g.L}^{-1}$ em 25 h de cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de glicose até 25 h de cultivo, após esse período a glicose continuou sendo consumida e utilizada para a produção de surfactina, de acetato (Figura 4.17 (b)) e provavelmente de outros ácidos. A produção de surfactina ocorreu logo no início e permaneceu ao longo de todo o cultivo, atingindo produção máxima de $85,2 \text{ mg.L}^{-1}$ em 49 h de cultivo. Aumento satisfatório de $49,7 \text{ mg.L}^{-1}$ para $85,2 \text{ mg.L}^{-1}$ na produção de surfactina foi observado com o aumento da concentração de 10 g.L^{-1} (ensaio C/N 3,6 do item 4.2.2) para 15 g.L^{-1} de glicose no meio.

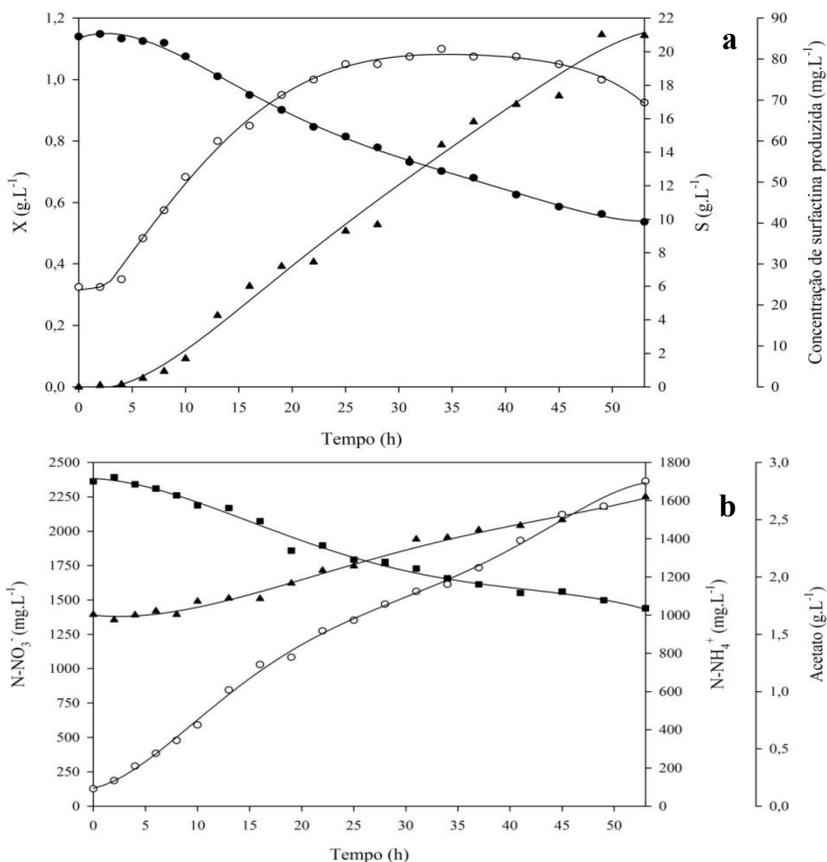
Na Figura 4.17 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 utilizou N-NO_3^- nos instantes iniciais e como já foi observado nos ensaios anteriores, houve um aumento na concentração de N-NH_4^+ de 953 mg.L^{-1} para 1800 mg.L^{-1} , em virtude do processo de amonificação anaeróbia no nitrato. Observou-se ainda um residual de aproximadamente 500 mg.L^{-1} de N-NO_3^- ao final do ensaio. O acetato começou a ser produzido a partir de 2 h de cultivo, simultaneamente ao consumo de glicose, e sua produção foi acompanhada pelo consumo desta até o final do cultivo, quando apresentou produção máxima de $3,50 \text{ g.L}^{-1}$, em 49 h.

Figura 4.17 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (○)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (\blacktriangle) e (b) concentração de $N\text{-NO}_3^-$ (\blacksquare), concentração de $N\text{-NH}_4^+$ (\blacktriangle) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio A em meio MM (1 g.L⁻¹ de extrato de levedura), adicionado de 15 g.L⁻¹ de glicose e 10,2 g.L⁻¹ de NaNO₃.



Realizou-se outro ensaio aumentando-se a concentração de glicose para 20 g.L^{-1} e a concentração de NaNO_3 para $13,6 \text{ g.L}^{-1}$ e mantendo-se a relação C/N 3,6. Os resultados referentes ao ensaio B estão apresentados na Figura 4.18.

Figura 4.18 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO_3^- (■), concentração de N-NH_4^+ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio B em meio MM (1 g.L^{-1} de extrato de levedura), adicionado de 20 g.L^{-1} de glicose e $13,6 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 .



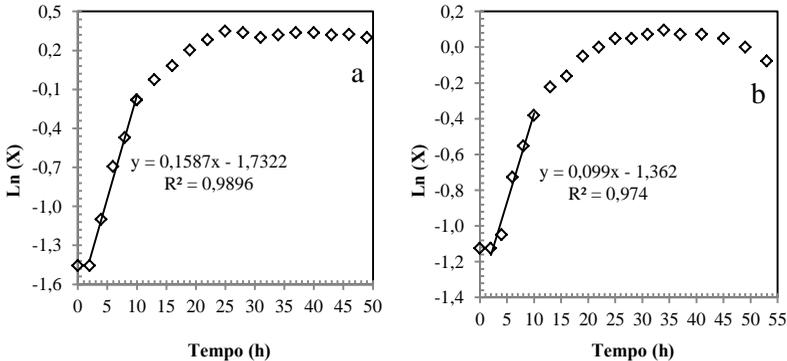
Como pode ser observado na Figura 4.18 (a) *B. subtilis* ATCC 21332 apresentou uma ligeira fase de adaptação ao meio de cultivo (também observada na curva do Ln – Figura 4.19 (b)) e a concentração máxima de biomassa em 34 h de cultivo foi de $1,10 \text{ g.L}^{-1}$. Embora a produção máxima de biomassa tenha ocorrido em 34 h, foi possível observar que tanto o crescimento celular quanto o consumo de glicose foram mais acentuados até 25 h, sendo que após esse período o crescimento celular foi mínimo, ainda que houvesse substrato disponível no meio. Mesmo havendo fonte de nitrogênio disponível no meio (Figura 4.18 (b)) após 45 h de cultivo o consumo de glicose praticamente cessou, deixando um residual próximo a 10 g.L^{-1} . Uma hipótese para o microrganismo ter deixado de consumir a fonte de carbono é que com o aumento na concentração de glicose pode ter havido restrição de algum micronutriente no meio de cultivo, limitando o crescimento celular e consequentemente o consumo de glicose. Dessa forma, observa-se menor crescimento celular neste ensaio (20 g.L^{-1} de glicose) se comparado ao ensaio A (15 g.L^{-1} de glicose), que foi de $1,42 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa.

Observa-se que a produção de surfactina iniciou em aproximadamente 6 h e esta foi produzida praticamente até o final do cultivo, quando em 49 h alcançou produção máxima de $85,9 \text{ mg.L}^{-1}$. A produção de surfactina e o consumo de glicose ocorreram simultaneamente no período compreendido entre 6 e 49 h. Foi possível observar um comportamento semelhante no perfil de produção do produto entre os ensaios A e B, pois nos dois casos a produção ocorreu praticamente durante todo o cultivo, além da concentração final de surfactina apresentar praticamente o mesmo valor, 85 mg.L^{-1} . Nesse caso, esperava-se maior produção de surfactina no ensaio B, devido à maior concentração inicial de glicose, no entanto, isso provavelmente não aconteceu porque apenas metade da glicose foi consumida.

Nota-se na Figura 4.18 (b) baixo consumo de N-NO_3^- , pois não mais que 40 % da concentração inicial foi utilizada, sendo que o baixo consumo foi acompanhado pelo menor aproveitamento da glicose. Observa-se também que a partir de 8 h de cultivo a concentração de N-NH_4^+ começou a aumentar, passando de 1000 mg.L^{-1} para 1620 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ (entre 8 e 53 h), apresentando um acréscimo de 620 mg.L^{-1} . A produção de acetato foi verificada ao longo de todo o cultivo e a produção máxima de $2,84 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 53 h de cultivo.

Na Figura 4.19 encontra-se a representação logarítmica da concentração celular (X) em função do tempo para os cultivos A e B.

Figura 4.19 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 durante os ensaios A (a) e B (b).



Na Figura 4.19 observa-se que nos dois ensaios (A e B) *B. subtilis* ATCC 21332 apresentou fase de adaptação ao meio de cultivo de 2 h e permaneceu em fase exponencial de crescimento por aproximadamente 8 h, sendo μ_{\max} de $0,158 \text{ h}^{-1}$, obtido no ensaio A, maior que μ_{\max} de $0,099 \text{ h}^{-1}$, encontrado no ensaio B. O acréscimo na concentração de glicose não contribuiu para uma maior velocidade específica máxima de crescimento, assim como também já foi observado no crescimento celular. Os valores de μ_{\max} dos cultivos A (15 g.L^{-1} de glicose) e B (20 g.L^{-1} de glicose), encontram-se inferiores ao valor de μ_{\max} de $0,194 \text{ h}^{-1}$, obtido no ensaio relação C/N 3,6 (10 g.L^{-1} de glicose), mostrado anteriormente no item 4.2.2. Levando-se em conta que a relação C/N e o meio de cultivo (MM) foram iguais, diferindo somente na concentração de glicose, esses resultados sugerem que nessa condição de cultivo o aumento da concentração de glicose acarretou em menor valor de μ_{\max} . Pode-se também observar que o valor de μ_{\max} não teve relação direta com a produção de surfactina, uma vez que, os valores de μ_{\max} nos ensaios A e B foram diferentes e a produção de surfactina foi praticamente igual. Comportamento semelhante foi observado por De Oliveira (2010) no cultivo de *B. subtilis* LAMI005 para a produção de surfactina. O autor observou que não houve relação

direta entre o aumento da concentração da fonte de carbono com o valor de μ_{\max} e com a produção de surfactina.

Os resultados do estudo cinético referentes aos cultivos A e B estão apresentados na Tabela 4.3

Tabela 4.3 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_X) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET/C-GLIC}$), entre os ensaios A e B.

Ensaios	Glicose (g.L ⁻¹)	NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	P_r (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (mg _{surf} .g _{glic} ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{C-ACET,C-GLIC}^{-1}$ (g _{C-acet} .g _{C-glic} ⁻¹)
A	15,0	10,2	1,74	5,68	0,048	0,220
B	20,0	13,6	1,75	8,13	0,027	0,246

A produtividade em surfactina (P_r) foi praticamente igual nos cultivos A e B, apresentando um valor médio de 1,75 mg.L⁻¹.h⁻¹ em 49 h. Yakimov et al. (1995) estudaram a produção do biosurfactante lichenisina A por *B. licheniformis* BAS50 em meio definido contendo 20 g.L⁻¹ de glicose em condição anaeróbia e os resultados indicaram produtividade de 1,66 mg.L⁻¹.h⁻¹ de lichenisina A em 96 h de cultivo. Comparando-se os dados desses autores com os obtidos no presente estudo, nota-se que nos ensaios A e B obteve-se maior produtividade em surfactina, com menor concentração inicial de substrato no caso do ensaio A, ambos em um tempo de cultivo bem reduzido, indicando dessa forma que no presente estudo o processo foi mais eficiente.

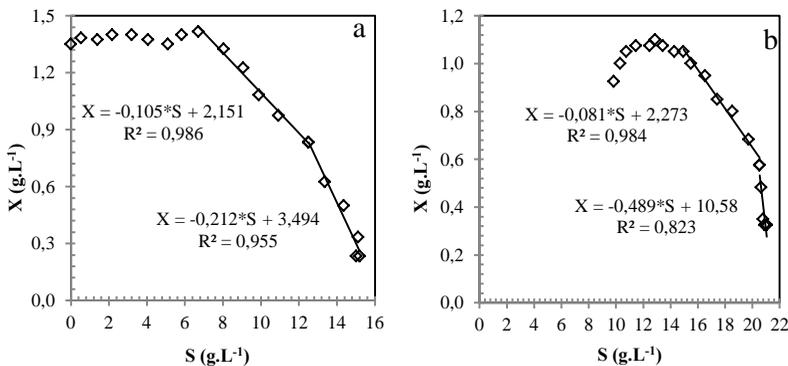
Como visto, os valores de P_r foram muito próximos, no entanto os valores do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram bem diferentes, sendo que no ensaio B o $Y_{P/S}$ de 8,13 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹ foi superior ao valor do $Y_{P/S}$ de 5,68 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹ encontrado no ensaio A, isso porque no ensaio B obteve-se a mesma produção de surfactina com consumo menor de glicose. Porém, cabe ressaltar que em se tratando da economia do processo o ensaio A torna-se mais interessante, uma vez que, a concentração inicial de substrato foi menor e com isso menor custo no processo.

O valor de produtividade em células (P_X) de 0,027 g.L⁻¹.h⁻¹ do B foi inferior a P_X de 0,048 g.L⁻¹.h⁻¹ obtido no ensaio A. Esse resultado já era esperado, uma vez que, o crescimento celular no cultivo B foi menor. Similarmente aos resultados observados anteriormente no

conjunto de ensaios para a avaliação da relação C/N, nos cultivos A e B também foi verificado uma relação diretamente proporcional entre o valor de P_X e o valor de μ_{\max} . Com relação ao fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET.C-GLIC}^{-1}$), nota-se na Tabela 4.3 que os valores foram muito semelhantes, em torno de $0,23 \text{ g}_{C-acetato} \cdot \text{g}_{C-glicose}^{-1}$. Comparando-se os resultados de P_X e do $Y_{C-ACET.C-GLIC}^{-1}$ dos cultivos A e B com os obtidos no estudo da relação C/N mostrados anteriormente no item 4.2.2 (Tabela 4.2) foi possível notar que os ensaios A e B apresentaram menores valores de P_X e do $Y_{C-ACET.C-GLIC}^{-1}$. Com estes resultados pode-se sugerir que o aumento na concentração de substrato de 10 g.L^{-1} para 15 e 20 g.L^{-1} de glicose poderia contribuir para uma maior produção de outros ácidos, além do acetato, pois de acordo Yu et al. (2011) *B. subtilis* quando cultivado em excesso de glicose metaboliza uma grande quantidade da mesma e converte a acetato, lactato e acetoína. No entanto, como no presente estudo somente o acetato foi quantificado, a identificação de quais outros ácidos estão sendo formados não pode ser confirmada.

Na Figura 4.20 encontra-se a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, que resultou em uma relação linear, cujo coeficiente angular permite a determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

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 nos ensaios A (a) e B (b).



Assim como já observado nos cultivos anteriores, nota-se na Figura 4.20 a presença de duas fases distintas de consumo de substrato durante o crescimento.

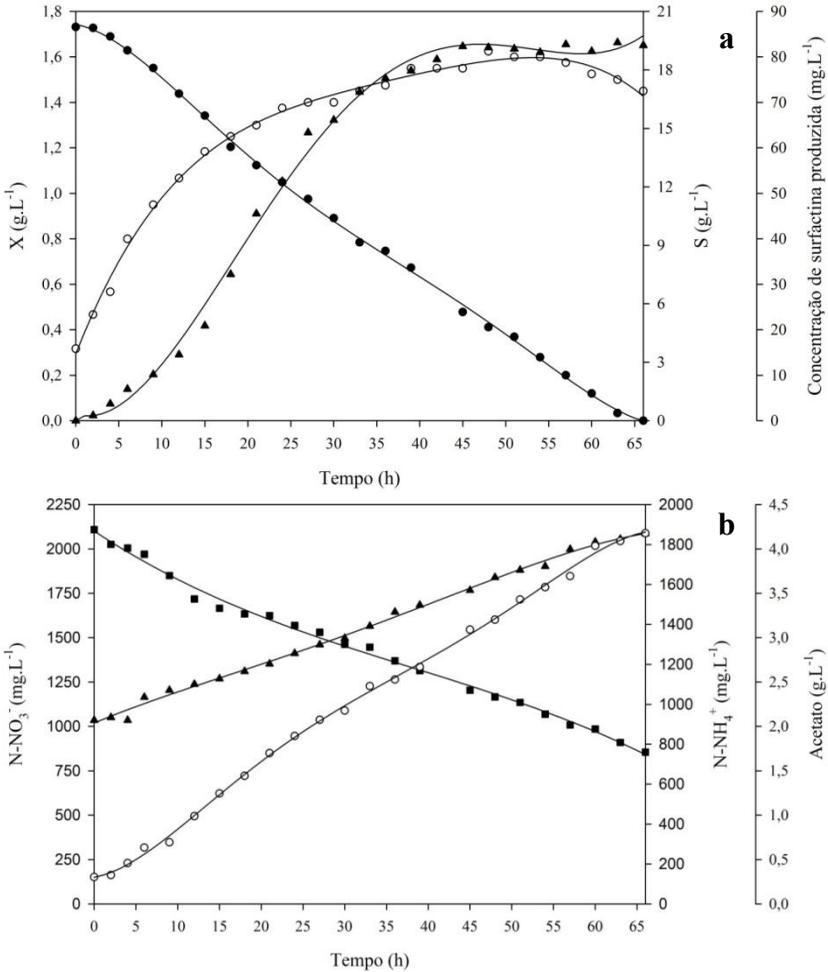
Na Figura 4.20 (a) observa-se que nas primeiras horas do cultivo (valores elevados de substrato) houve uma maior produção de células com relação ao consumo de substrato e, em seguida, o crescimento celular tornou-se menos acentuado, resultando assim em um $Y_{X/S}$ para o primeiro trecho de $0,212 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ e de $0,105 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ para o segundo trecho.

No caso do ensaio B (Figura 4.20 (b)), um comportamento semelhante foi observado com relação às duas fases de consumo de substrato, no entanto, como é possível observar, nas horas iniciais o consumo de glicose foi muito baixo, ou seja, houve produção de biomassa praticamente sem o consumo dessa fonte de carbono. Em seguida, o consumo de substrato foi mais acentuado, porém não se observou grandes aumentos da concentração da biomassa nesta fase de consumo de substrato, resultando assim em um $Y_{X/S}$ de $0,489 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ e $0,081 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ para o primeiro e segundo trecho do gráfico, respectivamente.

Verificou-se no ensaio B que a glicose não foi totalmente consumida, provavelmente devido à limitação de algum micronutriente no meio mineral (MM), realizando-se assim dois cultivos com as mesmas concentrações de glicose ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e NaNO_3 ($13,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) utilizando os meios MM1 e MM2. O ensaio C foi realizado utilizando o meio MM1 (adicionado de micronutrientes) e o ensaio D foi conduzido no meio MM2 (adicionado de micronutrientes e suplementado com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extrato de levedura) (meios descritos no item 3.3). Na Figura 4.21 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio C.

Pode-se notar na Figura 4.21 (a) que *B. subtilis* ATCC 21332 não apresentou fase de adaptação ao meio de cultura e atingiu concentração celular máxima de $1,63 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em 48 h de cultivo. Ao comparar os valores do crescimento celular obtidos neste ensaio C, com o ensaio B (Figura 4.18 (a)), que foi de $1,10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, nota-se que no ensaio C o crescimento foi maior, evidenciando que a adição de micronutrientes ao meio de cultura influenciou positivamente o crescimento celular. Diferentemente do observado no ensaio B, no qual somente $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose foram consumidas, neste cultivo em 66 h foi observado consumo total desta.

Figura 4.21 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio C em meio MM1 (1 g.L⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 20 g.L⁻¹ de glicose e 13,6 g.L⁻¹ de NaNO₃.



A produção de surfactina foi observada desde o início do cultivo e acompanhada pelo crescimento celular praticamente durante todo o tempo de cultivo, sendo que a produção máxima de $83,2 \text{ mg.L}^{-1}$ foi obtida em 45 h de cultivo. Esta concentração foi ligeiramente inferior à relatada no ensaio B, que foi de $85,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina.

Segundo Wei e Chu (2002) a adição de íons metálicos como, por exemplo, Mn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} , tem sido muito estudada devido à capacidade desses íons em aumentar a produção de surfactina e, de acordo com os autores, o íon metálico Mn^{2+} é o que mais influencia na produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332. O efeito da suplementação do meio com Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mn^{2+} , sobre o crescimento celular e produção de surfactina foi avaliado por Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008), que observaram um aumento tanto no crescimento celular quanto na produção de surfactina por *B. subtilis*. Huang et al. (2015) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de Mn^{2+} no meio de cultivo, sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332. Os autores observaram que a produção de surfactina aumentou 6,2 vezes quando o meio foi suplementado com $5,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de Mn^{2+} em comparação ao meio sem adição e que não houve efeito positivo da suplementação no crescimento celular.

No presente estudo o meio de cultivo foi suplementado com $9,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de Mn^{2+} , mais $0,24 \text{ mg.L}^{-1}$ de Co^{2+} , $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ de Mo^{2+} e $0,006 \text{ mg.L}^{-1}$ de Al^{3+} . Ficou evidente que a adição destes micronutrientes no meio de cultivo contribuiu para que *B. subtilis* ATCC 21332 consumisse totalmente a glicose disponível aumentando assim a concentração celular. No entanto, não favoreceu a síntese de surfactina, contrapondo os trabalhos mencionados.

Na Figura 4.21 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 utilizou N-NO_3^- nos instantes iniciais, sendo que a redução do N-NO_3^- foi acompanhada pelo consumo de glicose durante todo o cultivo. Através do processo de amonificação anaeróbia do nitrato, é possível observar o decréscimo na concentração N-NO_3^- e o acréscimo na concentração de N-NH_4^+ , podendo-se notar um aumento de 934 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ ao final das 66 h de cultivo. O acetato começou a ser produzido no início do cultivo e a sua produção foi acompanhada pelo consumo de glicose durante todo o cultivo. A produção máxima de $4,18 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 66 h de cultivo. Nota-se que no ensaio C

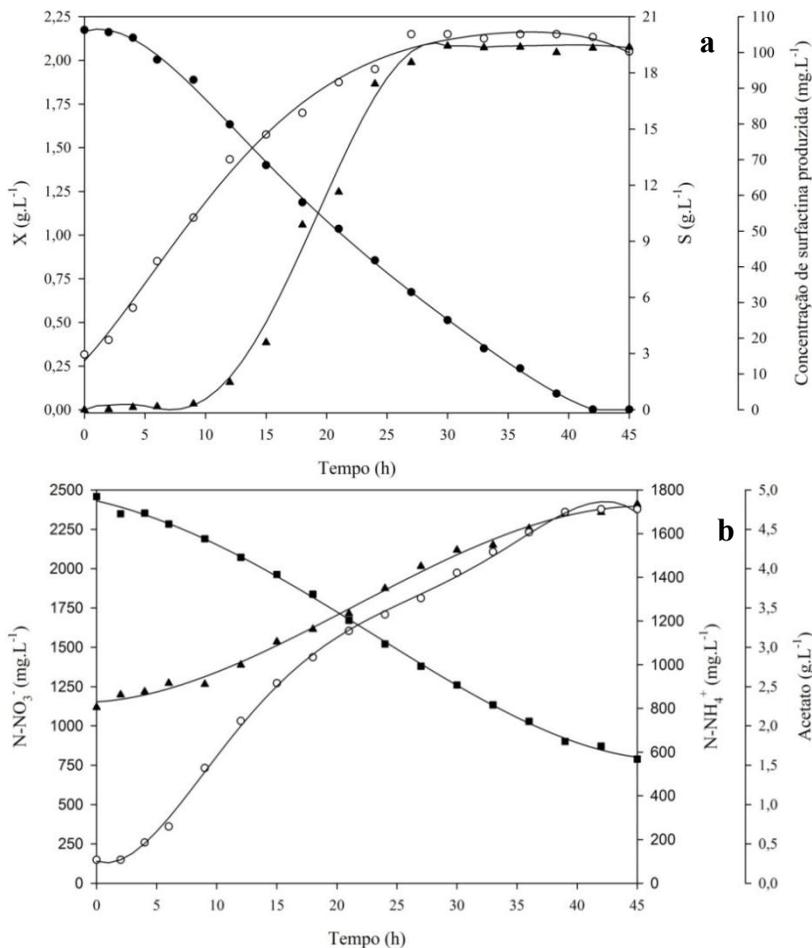
(Figura 4.21 (b)) houve maior produção de acetato e maior formação de $N-NH_4^+$ em comparação ao ensaio B (Figura 4.18 (b)), sendo que essas diferenças são atribuídas ao maior consumo de glicose e de $N-NO_3^-$ no meio de cultivo.

Após a avaliação da influência da adição de micronutrientes no meio de cultivo, foi realizado um cultivo utilizando o meio MM2, no qual se avaliou o efeito da adição de micronutrientes combinada à suplementação com extrato de levedura (1 g.L^{-1}), sobre a produtividade em surfactina. Os resultados referentes ao ensaio D estão apresentados na Figura 4.22.

O crescimento celular teve início já nos instantes iniciais e a concentração celular máxima de $2,15 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 27 h de cultivo (Figura 4.22 (a)). Observou-se que a concentração celular de $2,15 \text{ g.L}^{-1}$, obtida com o meio contendo 2 g.L^{-1} de extrato de levedura (ensaio D), foi maior que a concentração celular de $1,63 \text{ g.L}^{-1}$, alcançada com o meio contendo 1 g.L^{-1} de extrato de levedura (ensaio C – 4.21 (a)), demonstrando que a suplementação com 1 g.L^{-1} de extrato de levedura influenciou positivamente o crescimento celular. Além disso, a suplementação do meio com extrato de levedura reduziu o tempo da cinética em 24 h, quando comparado ao ensaio C. A adição de extrato de levedura estimula o crescimento celular devido às vitaminas do complexo B, que são necessárias à formação de enzimas, coenzimas, aminoácidos e outros importantes componentes estimulantes do crescimento microbiano (FOX; BALA, 2000; REIS; SÉRVULO; DE FRANÇA, 2004), além de poder ser utilizada como fonte de carbono e nitrogênio (BERBERT-MOLINA et al., 2008).

A surfactina começou a ser sintetizada após 9 h de cultivo, momento em que *B. subtilis* ATCC 21332 apresentava-se no final de fase exponencial de crescimento celular (observado na curva do \ln - Figura 4.23 (b)), porém, observou-se uma produção acentuada no período compreendido entre 9 e 30 h, quando atingiu produção máxima de $101,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Além do crescimento celular o meio contendo o dobro da concentração de extrato de levedura também influenciou positivamente a produção de surfactina. Pois, comparando a produção obtida neste cultivo que foi de $101,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina, com o ensaio C que apresentou produção de $83,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina, pode-se notar um aumento na produção de biosurfactante de $18,6 \text{ mg.L}^{-1}$.

Figura 4.22 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (○)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (\blacktriangle) e (b) concentração de $N\text{-NO}_3^-$ (\blacksquare), concentração de $N\text{-NH}_4^+$ (\blacktriangle) e concentração de acetato (\circ). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio D em meio MM2 (2 g.L⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 20 g.L⁻¹ de glicose e 13,6 g.L⁻¹ de NaNO₃.

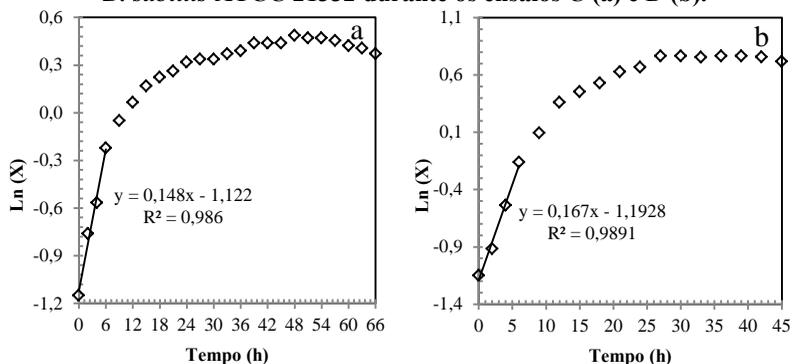


De acordo com Stanbury, Whitaker e Hall (2003) a utilização de extrato de levedura, fonte de nitrogênio orgânico, além de possuir vitaminas e minerais, visa fornecer maior variedade de aminoácidos ao meio de cultivo, o que pode contribuir com a produção de biossurfactante. Entretanto, de acordo com trabalhos anteriores, a utilização de extrato de levedura para a produção de surfactina é contraditória (REIS; SÉRVULO; DE FRANÇA, 2004; ROCHA et al., 2009; DE SOUSA, 2012). Reis, Sérvulo e De França (2004) observaram que a suplementação de 1 g.L^{-1} de extrato de levedura no meio mineral contendo 20 g.L^{-1} de sacarose, não favoreceu a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633, exercendo maior efeito sobre o crescimento celular. De Sousa (2012) estudou o efeito do aumento 0,4 para $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ na concentração de extrato de levedura em meio mineral contendo 20 g.L^{-1} de glicerol, como fonte de carbono, para a produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI009. Os resultados mostraram que não houve aumento na produção de surfactina quando a concentração de extrato de levedura foi aumentada e os valores foram de 39 e 35 mg.L^{-1} , respectivamente. Entretanto, Rocha et al. (2009) avaliaram a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI008 em meio mineral contendo 10 g.L^{-1} de glicose, suplementado ou não de 5 g.L^{-1} de extrato de levedura. Os resultados mostraram que a suplementação do meio com extrato de levedura aumentou a produção de biossurfactante, a qual foi estimada pela redução de 24,1 % da tensão superficial do caldo de fermentação livre de células.

Nota-se na Figura 4.22 (b) que o N-NO_3^- foi consumido durante todo o cultivo e à medida que este foi sendo reduzido a concentração de N-NH_4^+ foi aumentando. O aumento de 930 mg.L^{-1} na concentração de N-NH_4^+ , ao final das 42 h de cultivo, foi praticamente igual ao acréscimo de 934 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ encontrado no ensaio C (Figura 4.21 (b)). A produção de acetato teve início após 2 h de cultivo iniciando juntamente com o consumo de glicose, sendo que a produção máxima de $4,18 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 42 h de cultivo.

A fim de comparar os valores de μ_{max} entre os cultivos C e D, foi construída a Figura 4.23 onde se encontra a representação logarítmica da concentração celular com o tempo de cultivo.

Figura 4.23 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 durante os ensaios C (a) e D (b).



B. subtilis ATCC 21332 não apresentou fase de adaptação (lag) ao meio de cultivo e permaneceu em fase exponencial de crescimento por aproximadamente 6 h. A suplementação de micronutrientes utilizada para compor os meios MM1 e MM2, empregado nos ensaios C e D, respectivamente, pode ter contribuído na ausência da fase lag, pois os demais cultivos realizados (A e B) foram conduzidos sem a suplementação de micronutrientes e foram observadas fases de adaptação de 2 h. O valor de μ_{\max} de $0,167 \text{ h}^{-1}$ do ensaio D encontra-se comparativamente maior ao obtido no ensaio C que foi de $0,148 \text{ h}^{-1}$. Nesse caso, sugere-se que a suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura pode ter colaborado para o maior valor de μ_{\max} do ensaio D, visto que, foi a única alteração efetuada.

A Tabela 4.4 apresenta uma comparação dos resultados cinéticos obtidos durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 nos ensaios C e D.

Tabela 4.4 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET}/C\text{-GLIC}}$), entre os ensaios C e D.

Ensaios	Glicose (g.L^{-1})	NaNO_3 (g.L^{-1})	P_r ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($\text{mg}_{\text{surf}}.\text{g}_{\text{glic}}^{-1}$)	P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{C\text{-ACET}.C\text{-GLIC}}^{-1}$ ($\text{g}_{C\text{-acet}}.\text{g}_{C\text{-glic}}^{-1}$)
C	20,0	13,6	1,83	5,69	0,027	0,196
D	20,0	13,6	3,39	6,57	0,068	0,223

A suplementação do meio com extrato de levedura influenciou positivamente os resultados cinéticos referentes à produção de surfactina e crescimento celular. A produtividade em surfactina (P_r) foi aproximadamente 2 vezes maior quando a concentração de extrato de levedura foi aumentada de 1 g.L^{-1} (ensaio C) para 2 g.L^{-1} (ensaio D). Nota-se que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) de $6,57 \text{ mg}_{\text{surfactina}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$, encontrado no ensaio D, foi superior ao valor do $Y_{P/S}$ de $5,69 \text{ mg}_{\text{surfactina}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ encontrado no ensaio C. A produtividade em células (P_x) foi a variável mais influenciada pelo acréscimo na concentração de extrato de levedura no meio. O valor de P_x de $0,068 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, obtido com o meio contendo 2 g.L^{-1} de extrato de levedura (ensaio D), mostrou-se 2,5 vezes maior que o valor de P_x de $0,027 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, encontrado no meio contendo 1 g.L^{-1} (ensaio C). O efeito positivo do aumento na concentração do meio com extrato de levedura sobre a produtividade em surfactina e em células também foi relatado por outros autores (ROCHA et al., 2009; DE SOUSA, 2012) e corrobora com os resultados encontrados neste estudo. Rocha et al. (2009) cultivando *B. subtilis* LAMI008 em meio mineral contendo suco de caju na concentração de 10 g.L^{-1} de glicose observaram que a adição de 5 g.L^{-1} de extrato de levedura no meio de cultivo aumentou a P_r de $5,83 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para $72,92 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e a P_x sofreu um acréscimo de $0,092 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para $0,142 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. De Sousa (2012) estudou o efeito do aumento 0,4 para 0,8 g.L^{-1} na concentração de extrato de levedura em meio mineral contendo 20 g.L^{-1} de glicerol, como fonte de carbono, para a produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI009. Os resultados mostraram que a P_r aumentou de $1,05 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para $5,10 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ quando a concentração de extrato de levedura foi duplicada.

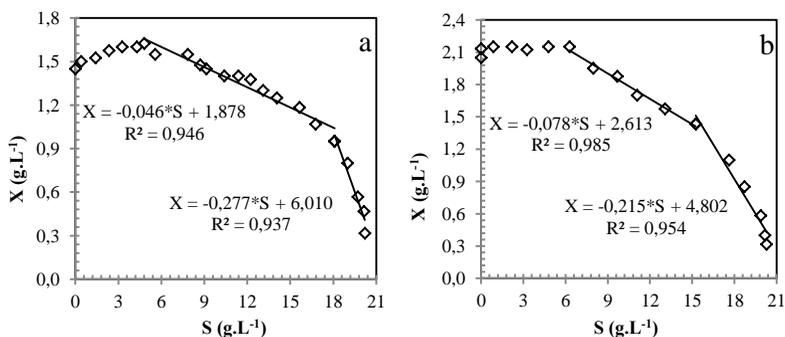
Tanto no presente trabalho, quanto nos estudos citados a suplementação com extrato de levedura influenciou positivamente na produtividade em surfactina. No entanto, percebem-se diferenças entre os valores de P_r , que poderiam estar relacionadas a diversos fatores como, por exemplo, a cepa produtora, o tipo e a concentração da fonte de carbono, a concentração de extrato de levedura suplementada no meio, diferente da usada neste estudo e, também quanto ao fornecimento de oxigênio no meio, que diferentemente do presente estudo, nos trabalhos citados o processo ocorreu em aerobiose. No entanto, o valor de P_r de $3,39 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em surfactina, encontrado no ensaio D está de acordo com as referências da literatura para processos anaeróbios. O

valor reportado neste estudo é superior ao valor de P_r de $2,27 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ relatado por Yakimov et al. (1997) no cultivo anaeróbio de *B. licheniformis* BAS50, em meio definido contendo 20 g.L^{-1} de sacarose como fonte de carbono.

Com relação ao fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C\text{-ACET.C-GLIC}}^{-1}$), nota-se na Tabela 4.4 que os valores foram próximos, apresentando valor médio de $0,21 \text{ g}_{C\text{-acetato}} \cdot \text{g}_{C\text{-glicose}}^{-1}$. Este valor é semelhante ao valor médio do $Y_{C\text{-ACET.C-GLIC}}^{-1}$ de $0,23 \text{ g}_{C\text{-acetato}} \cdot \text{g}_{C\text{-glicose}}^{-1}$ obtido nos cultivos A e B (Tabela 4.3), sugerindo dessa forma que nem a adição de micronutrientes, tampouco a suplementação do meio com extrato de levedura, influenciaram a conversão de C-glicose em C-acetato.

Na Figura 4.24 encontra-se a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, que resultou em uma relação linear, cujo coeficiente angular permite a determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Figura 4.24 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 nos ensaios C (a) e D (b).

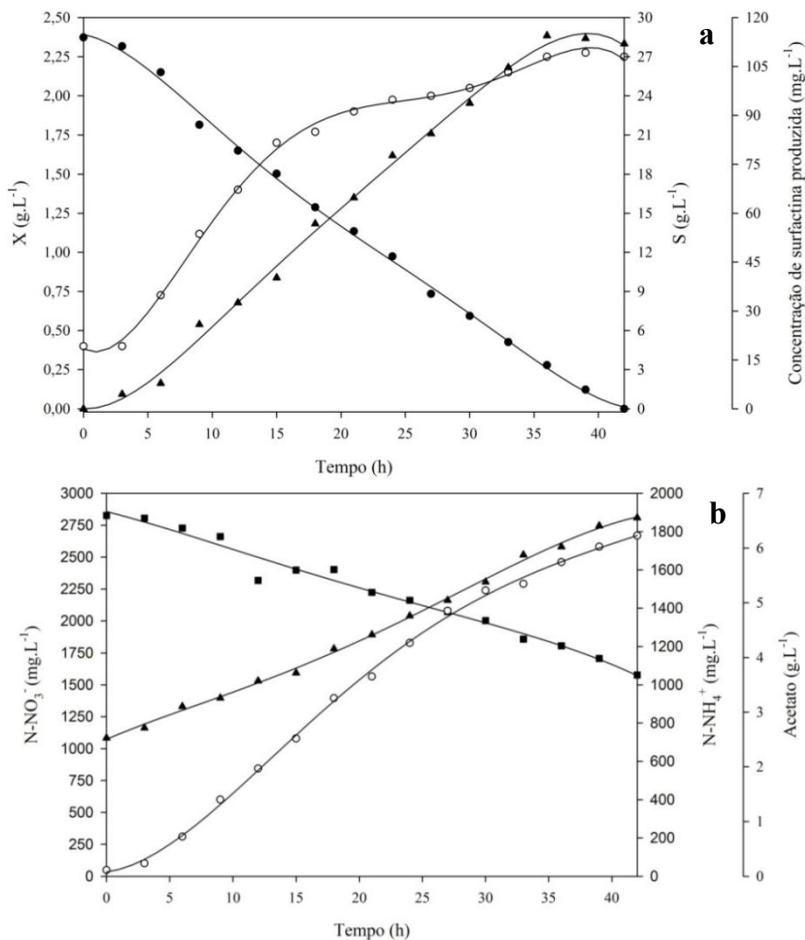


No início dos cultivos observa-se menor consumo de substrato e maior produção de células, ou seja, maior valor do fator de conversão ($Y_{X/S}$) e por volta de 18 e 15 g.L^{-1} de glicose (ensaios C e D, respectivamente) observa-se que a produção de células diminui em relação ao consumo de substrato. Também foi possível observar na Figura 4.24 (a) e (b), que quando a concentração de substrato ficou

próxima a 6 g.L^{-1} de glicose, *B. subtilis* ATCC 21332 entrou em fase estacionária de crescimento e o consumo de substrato ocorreu de forma mais branda. Nos dois cultivos, o primeiro trecho do gráfico representou os maiores valores do $Y_{X/S}$, sendo que esses trechos correspondem à fase de crescimento exponencial de *B. subtilis* ATCC 21332. Embora o ensaio D tenha apresentado valor de $\mu_{\text{máx}}$ ($0,167 \text{ h}^{-1}$) maior que o valor do ensaio C ($0,148 \text{ h}^{-1}$), mesmo comportamento não foi verificado para o valor do $Y_{X/S}$ (primeiro trecho do gráfico).

Através da comparação dos resultados dos cultivos C e D verificou-se que houve influência positiva da combinação da adição de micronutrientes e suplementação com extrato de levedura, sobre o crescimento celular e produtividade em surfactina. A maior produtividade em surfactina foi obtida no cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 utilizando o meio MM2. Dessa forma, esse meio foi selecionado para a realização de 2 cultivos com aumentos proporcionais das fontes de carbono e nitrogênio. Na Figura 4.25 estão apresentados os dados relativos ao cultivo E, o qual continha concentração inicial de 30 g.L^{-1} de glicose e $20,3 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 .

Figura 4.25 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio E em meio MM2 (2 g.L⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 30 g.L⁻¹ de glicose e 20,3 g.L⁻¹ de NaNO₃.



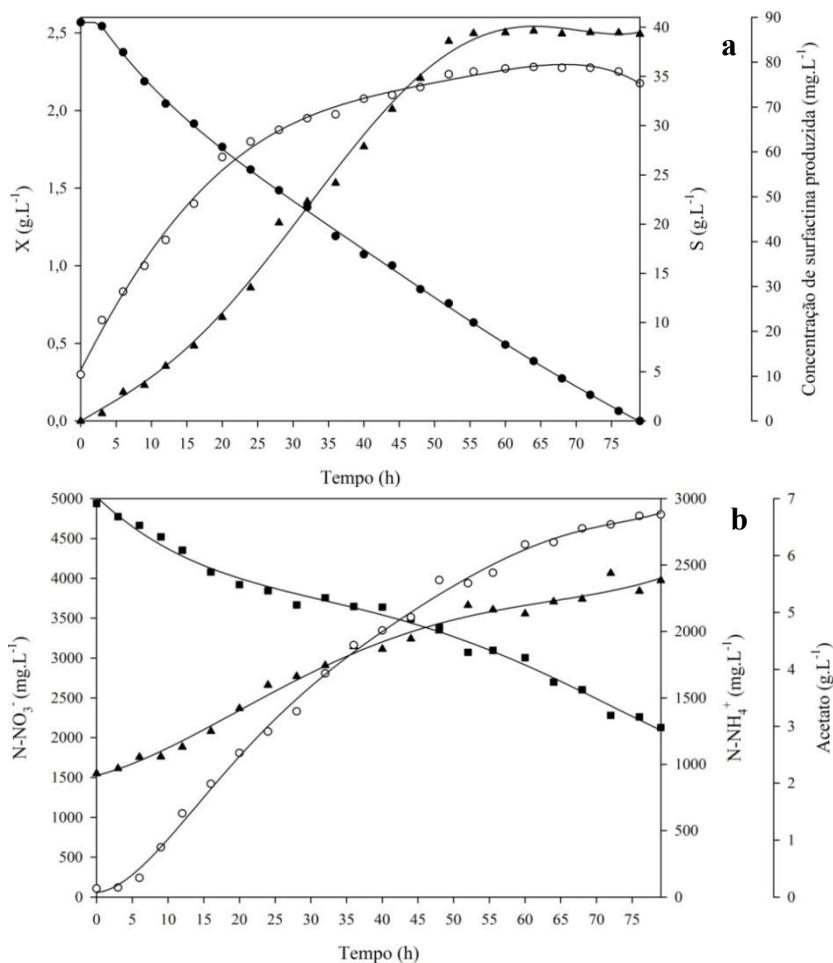
Observa-se na Figura 4.25 (a) que até aproximadamente 3 h de cultivo não houve crescimento celular e em 36 h *B. subtilis* ATCC 21332 atingiu concentração celular máxima de $2,25 \text{ g.L}^{-1}$, valor este ligeiramente superior ao de $2,15 \text{ g.L}^{-1}$, mostrado no ensaio D, como verificado anteriormente na Figura 4.22 (a). O crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de glicose até 36 h de cultivo e após 6 h esta foi exaurida do meio.

A surfactina começou a ser produzida logo no início do cultivo e a partir de 3 h a produção foi acompanhada pelo crescimento celular. A concentração máxima de $114,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina produzida foi alcançada em 36 h de cultivo, sendo superior a $101,8 \text{ mg.L}^{-1}$ obtida no ensaio D. Nota-se maior crescimento celular e maior produção de surfactina no ensaio E (30 g.L^{-1} de glicose) em comparação ao D (20 g.L^{-1} de glicose), no entanto, essas diferenças podem ser consideradas pequenas diante da maior concentração de substrato consumido.

Com os resultados mostrados na Figura 4.25 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 passou a utilizar N-NO_3^- a partir de 3 h de cultivo, sendo que a redução do mesmo foi acompanhada pelo aumento na concentração de N-NH_4^+ , que resultou em um acréscimo de 1150 mg.L^{-1} de N-NH_4^+ no final do cultivo. O acetato começou a ser produzido no início do cultivo e a sua produção foi acompanhada pelo consumo de glicose até o final do cultivo, quando atingiu concentração máxima de $6,23 \text{ g.L}^{-1}$, em 42 h.

Após o estudo da concentração inicial de glicose de 30 g.L^{-1} , realizou-se um ensaio com 40 g.L^{-1} de glicose e $27,1 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 , ensaio F, sendo os resultados apresentados na Figura 4.26.

Figura 4.26 (a) Evolução da concentração de biomassa (X (o)), concentração de glicose (S (●)) e concentração de surfactina produzida (▲) e (b) concentração de N-NO₃⁻ (■), concentração de N-NH₄⁺ (▲) e concentração de acetato (○). Cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio F em meio MM2 (2 g.L⁻¹ de extrato de levedura + micronutrientes), adicionado de 40 g.L⁻¹ de glicose e 27,1 g.L⁻¹ de NaNO₃.



Na Figura 4.26 (a) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 não apresentou fase de adaptação ao meio de cultura e a concentração máxima de biomassa de $2,27 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada em 60 h. Comparando-se o crescimento celular entre os ensaios D ($2,15 \text{ g.L}^{-1}$), E ($2,25 \text{ g.L}^{-1}$) e F ($2,27 \text{ g.L}^{-1}$) nota-se que os valores ficaram muito próximos, sendo um discreto aumento verificado entre os ensaios D e E. No entanto, praticamente não houve diferença entre os cultivos E e F. Esses resultados indicaram que o crescimento celular de *B. subtilis* ATCC 21332 não foi influenciado positivamente quando a concentração de glicose no meio de cultivo foi elevada a 40 g.L^{-1} . Entretanto Reis, Sérvulo e De França (2004) observaram que o crescimento celular de *B. subtilis* ATCC 6633 foi proporcional à concentração de sacarose até atingir 40 g.L^{-1} .

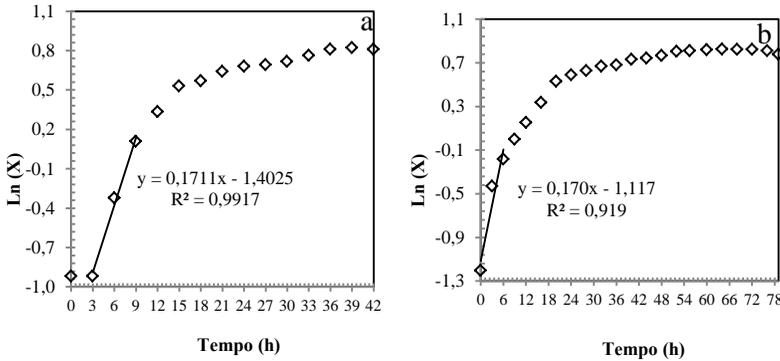
A surfactina começou a ser produzida no início do cultivo e sua produção foi acompanhada pelo crescimento celular até a mesma atingir a fase estacionária. A produção máxima de surfactina de $84,7 \text{ mg.L}^{-1}$ alcançada em 55 h de cultivo, foi menor que $114,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 4.25 (a)), encontrada no ensaio E, mostrando-se também inferior a $101,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 4.22 (a)), observada no cultivo D. Nota-se que o aumento da concentração inicial de glicose no meio de cultivo de 30 g.L^{-1} para 40 g.L^{-1} não favoreceu o crescimento celular, tampouco a síntese de surfactina, mostrando que na concentração de 40 g.L^{-1} os resultados obtidos foram insatisfatórios. Os resultados encontrados na literatura revelam que nem sempre elevadas concentrações iniciais de substrato acarretam em maiores produções de produto, sendo que a concentração inicial ideal de substrato apresenta divergências entre os estudos (KIM et al., 1997; REIS; SÉRVULO; DE FRANÇA, 2004; WILLENBACHER et al., 2015). Kim et al. (1997) reportaram que a concentração de biossurfactante aumenta quase que linearmente com acréscimos na concentração inicial de glicose até 40 g.L^{-1} . Os autores relataram ainda que concentrações acima de 40 g.L^{-1} de glicose causam pequenas mudanças na produção de biossurfactante por *B. subtilis* C9. Reis, Sérvulo e De França (2004) relataram que concentrações de 10, 20 e 40 g.L^{-1} de sacarose podem ser consideradas adequadas para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633, entretanto, a concentração máxima de produto foi observada com 10 g.L^{-1} de sacarose. Willenbacher et al. (2015) cultivando *B. subtilis* DSM 10^T sob condição anaeróbia verificou que acréscimos na concentração inicial de

2,5 até 7,5 g.L⁻¹ de glicose levaram a maiores produções de surfactina e, quando a concentração de glicose aumentou de 7,5 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹, praticamente não houve acréscimo na produção do produto. No entanto, no presente estudo esse comportamento foi observado a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose. Nota-se dentre o presente estudo e os trabalhos citados que cada um apresenta uma condição ideal de concentração inicial de substrato, para atingir a produção máxima de biossurfactante e que essa concentração inicial foi diferente entre todos os estudos. Essas diferenças são resultantes das inúmeras variáveis que interferem nos processos biotecnológicos como, por exemplo, o microrganismo produtor, o tipo da fonte de carbono, a temperatura de cultivo, entre outros. Cabe ressaltar também a importância de um equilíbrio entre os macro e micronutrientes do meio de cultivo, principalmente à medida que a fonte de carbono é aumentada, para que não haja limitação de micronutrientes interferindo no crescimento celular. Além disso, um valor alto da concentração inicial de substrato poderia ocasionar inibição no crescimento celular e por consequência prejudicar a produção do produto.

Na Figura 4.26 (b) observa-se que *B. subtilis* ATCC 21332 utilizou N-NO₃⁻ nos instantes iniciais, sendo que a redução deste foi acompanhada pelo aumento na concentração de N-NH₄⁺, resultando em um acréscimo de 1453 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ no final do cultivo. A produção de acetato foi verificada após 3 h de cultivo, concomitantemente ao consumo de glicose e a sua produção foi acompanhada pelo consumo da mesma até o final do cultivo, quando apresentou concentração máxima de 6,72 g.L⁻¹, em 79 h. Observou-se que houve maior produção de acetato e maior formação de N-NH₄⁺ no ensaio F (Figura 4.26 (b)) do que no E (Figura 4.25 (b)), sendo que essas diferenças são resultado do maior consumo de glicose e de N-NO₃⁻ no meio de cultivo.

Na Figura 4.27 encontra-se a representação logarítmica da concentração celular (X) em função do tempo para os cultivos E e F.

Figura 4.27 Representação logarítmica da concentração de biomassa (X) de *B. subtilis* ATCC 21332 durante os ensaios E (a) e F (b).



Verificou-se que em ambos os cultivos a fase de crescimento exponencial foi máxima e constante por aproximadamente 6 h e nota-se ainda que a velocidade específica máxima foi praticamente igual nos dois cultivos, apresentando valor médio de μ_{\max} de $0,170 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.27 (a) e (b)). Este valor ficou próximo ao valor de $0,167 \text{ h}^{-1}$, encontrado no cultivo D, sugerindo dessa forma que o valor de μ_{\max} não foi influenciado pela concentração inicial de substrato, uma vez que, os cultivos C, D e F continham concentrações iniciais de glicose diferentes, de 20, 30 e 40 g.L^{-1} , respectivamente. Comportamento semelhante foi relatado por De Oliveira (2010) cultivando *B. subtilis* LAMI005 em meio de cultivo contendo concentrações iniciais de açúcares redutores totais variando de 12,7 a 96,1 g.L^{-1} . O autor observou que os valores de velocidade específica máxima de crescimento foram idênticos, apresentando um valor médio de μ_{\max} de $0,177 \text{ h}^{-1}$, não sofrendo influência da concentração inicial de substrato no meio de cultivo. Entretanto Das e Sen (2011) cultivaram *B. coagulans* RK-02 em diferentes concentrações iniciais de glicose, variando de 0,05 a 120 g.L^{-1} , e observaram que o valor de μ_{\max} aumentou com o acréscimo na concentração inicial de glicose até 20 g.L^{-1} e acima do qual o valor de μ_{\max} diminuiu gradualmente. Comparando-se os valores de μ_{\max} de $0,167 \text{ h}^{-1}$ (ensaio D) e de $0,170 \text{ h}^{-1}$ (ensaios E e F) ao valor de μ_{\max} de $0,148 \text{ h}^{-1}$ (ensaio C) foi possível notar que o cultivo C, o qual foi realizado no meio sem suplementação de extrato de levedura, foi o que

apresentou o menor valor μ_{\max} , com relação aos demais. Embora os valores não apresentem grandes diferenças, esse resultado reforça a hipótese discutida anteriormente entre os ensaios C e D, de que os maiores valores de μ_{\max} foram obtidos quando *B. subtilis* ATCC 21332 foi cultivado no meio MM2, o qual apresentava o dobro da concentração de extrato de levedura.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados cinéticos obtidos nos cultivos E e F.

Tabela 4.5 Resultados obtidos da produtividade em surfactina (P_r), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{P/S}$), produtividade em células (P_X) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET/C-GLIC}$), entre os ensaios E e F.

Ensaio	Glicose (g.L ⁻¹)	NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	P_r (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (mg _{surf} .g _{glic} ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{C-ACET.C-GLIC}$ ⁻¹ (g _{C-acet} .g _{C-glic} ⁻¹)
E	30,0	20,3	3,18	4,55	0,051	0,218
F	40,0	27,1	1,63	2,96	0,033	0,165

O aumento na concentração de 30 g.L⁻¹ de glicose (ensaio E) para 40 g.L⁻¹ de glicose (ensaio F) influenciou negativamente os resultados cinéticos referentes à produção de surfactina e o crescimento celular. Os valores do fator de conversão de substrato em surfactina ($Y_{P/S}$) e da produtividade em células (P_X) sofreram redução de 54 %, quando a concentração de glicose no meio de cultivo aumentou de 30 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹, enquanto que a produtividade em surfactina (P_r) foi a variável mais afetada, apresentando redução de 95 %.

Conforme discutido anteriormente o aumento na concentração inicial de 20 g.L⁻¹ (ensaio D) para de 30 g.L⁻¹ (ensaio E) de glicose proporcionou um acréscimo na produção de surfactina de 101,8 mg.L⁻¹ para 114,5 mg.L⁻¹. No entanto, comparando-se os resultados cinéticos do ensaio E (Tabela 4.5) com os resultados obtidos no D (Tabela 4.4), foi possível notar que os valores de P_r de 3,39 mg.L⁻¹.h⁻¹, do $Y_{P/S}$ de 6,57 mg_{surfactina}.g_{glicose}⁻¹ e da P_X de 0,068 g.L⁻¹.h⁻¹, obtidos no cultivo D, foram superiores aos encontrados no ensaio E. Comportamento semelhante foi observado por Willenbacher et al. (2015) estudando a produção de surfactina em biorreator anaeróbio por *B. subtilis* DSM 10^T, em meio mineral contendo diferentes concentrações iniciais de glicose. Os autores observaram que o aumento na concentração de glicose de

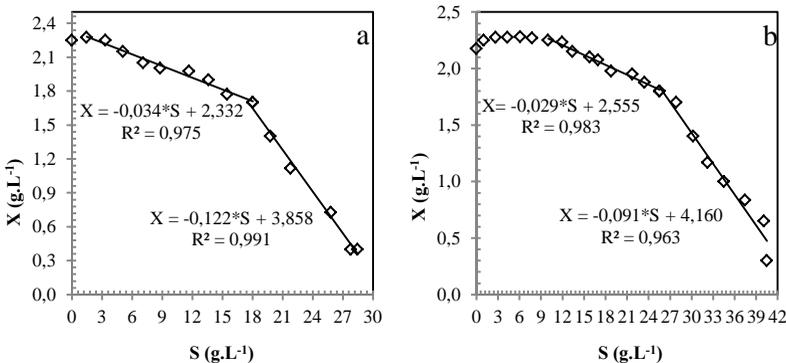
5 g.L⁻¹ para 7,5 g.L⁻¹ favoreceu a produção de surfactina, a P_r e o $Y_{P/S}$, no entanto, quando a concentração aumentou de 7,5 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹ de glicose, a produção foi praticamente igual, porém houve queda na P_r e no $Y_{P/S}$.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o crescimento celular e por consequência a formação do produto já apresentavam restrições com o emprego de glicose acima de 20 g.L⁻¹.

A análise dos resultados mostrou que a concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose (ensaio D) foi a mais adequada para a produção de surfactina em biorreator anaeróbico por *B. subtilis* ATCC 21332, pois nessa concentração obteve-se a maior produtividade em surfactina, 3,39 mg.L⁻¹.h⁻¹.

Na Figura 4.28 encontra-se a concentração de biomassa em função da concentração de substrato, que resultou em uma relação linear, cujo coeficiente angular permite a determinação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Figura 4.28 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 nos ensaios E (a) e F (b).

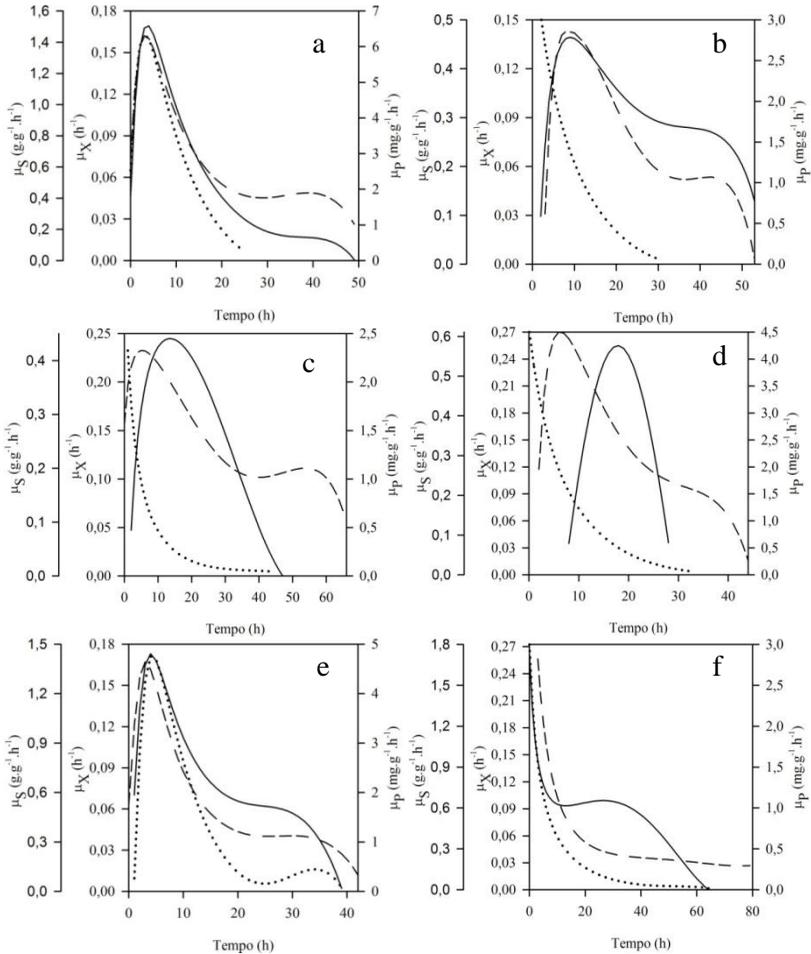


Devido à maior produção de células em relação ao consumo de substrato, foram obtidos maiores valores de $Y_{X/S}$ de 0,122 e 0,091 g_{células}·g_{glicose}⁻¹, para o primeiro trecho do gráfico, do que para o segundo trecho do gráfico de 0,034 e 0,029 g_{células}·g_{glicose}⁻¹, para os cultivos E e F, respectivamente (Figura 4.28 (a) e (b)).

Nota-se que o ensaio F (40 g.L⁻¹ de glicose) apresentou menores valores do $Y_{X/S}$ em ambos os trechos do gráfico em comparação ao ensaio E (30 g.L⁻¹ de glicose). Ainda, comparando-se os cultivos E e F ao cultivo D (Figura 4.24 (b)), neste último observou-se maiores valores do $Y_{X/S}$ em ambos os trechos do gráfico, com menor concentração inicial de glicose, 20 g.L⁻¹. Assim, foi possível notar que à medida que a concentração inicial de glicose aumentou de 20 para 30 e, em seguida, para 40 g.L⁻¹ os valores do $Y_{X/S}$ em ambos os trechos diminuiu, estabelecendo uma relação inversamente proporcional entre a concentração inicial de glicose e o valor do $Y_{X/S}$, nessas condições estudadas.

A Figura 4.29 ilustra o comportamento das velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de produção de surfactina (μ_P) para a classificação do produto formado (associado, parcialmente associado ou não associado ao crescimento celular), nos ensaios A, B, C, D, E e F, utilizando *B. subtilis* ATCC 21332

Figura 4.29 Gráficos representativos para classificação do produto formado nos ensaios em biorreator utilizando *B. subtilis* ATCC 21332. Ensaios A (a), B (b), C (c), D (d), E (e) e F(f). (····) μ_X , (—) μ_S , (---) μ_P .



Nota-se na Figura 4.29 (a), (e) e (f) que as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e de produção de surfactina (μ_P) apresentam perfis semelhantes, correlacionando-se bem. Observa-se ainda que a velocidade específica de crescimento (μ_X) de *B. subtilis*

ATCC 21332 apresentou, aproximadamente, o andamento das outras duas curvas, podendo-se afirmar que a formação do produto é um metabólito primário e está associado ao crescimento celular. Nos ensaios B (Figura 4.29 (b)) e C (Figura 4.29 (c)) observa-se que há uma semelhança entre as curvas para os perfis de velocidade de consumo de substrato e formação do produto. Além disso, nota-se que em ambos os casos a formação do produto iniciou em aproximadamente 2 h de cultivo, quando *B. subtilis* ATCC 21332 encontrava-se no início da fase de crescimento exponencial (ver Figura 4.19 (d) (ensaio B) e Figura 4.23 (a) (ensaio C)), sugerindo que a produção de surfactina esteve associada ao crescimento celular.

Comportamento diferente foi observado no ensaio D (Figura 4.29 (d)) no qual a surfactina começou a ser produzida em aproximadamente 8 h de cultivo, quando *B. subtilis* ATCC 21332 já havia deixado a fase exponencial de crescimento (Figura 4.23 (b)) e apresentava um valor de μ_x ($0,099 \text{ h}^{-1}$) consideravelmente baixo e, ainda, no instante que μ_s começou a diminuir. As curvas de velocidades específicas sugerem a existência de duas fases distintas para a Figura 4.29 (d): (1) onde a velocidade específica de consumo de glicose está diretamente relacionada à de crescimento do microrganismo, não havendo praticamente formação do produto (surfactina); e (2) onde há uma boa semelhança entre os perfis das três velocidades específicas e que, portanto se correlacionam bem. Nesse caso pode-se dizer que se trata de um metabólito primário, parcialmente associado ao crescimento celular (SCHMIDELL et al., 2001). Conforme mencionado anteriormente o meio de cultura em que o microrganismo é cultivado é um dos fatores que interfere no fato de o produto formado estar ou não associado ao crescimento celular (APARNA; SRINIKETHAN; HEGDE, 2012). Entretanto, no presente trabalho embora com algumas diferenças entre os perfis das curvas, não foi possível estabelecer uma correlação entre os diferentes meios utilizados, parecendo não haver qualquer influência destes sobre a classificação do produto, indicando que o mesmo esteve sempre associado ao crescimento celular. Este comportamento está de acordo com De Oliveira et al., (2013) que indicaram a síntese de surfactina associada ao crescimento celular ao cultivar *B. subtilis* LAMI005 em diferentes meio de cultivo.

Alguns autores sugerem que a produção de surfactina a partir de *B. subtilis* ATCC 21332 é associada ao crescimento celular (BENCE,

2011; MARIN et al., 2015), enquanto outros autores observaram que a produção ocorreu no meio (FOX; BALA, 2000) e no final da fase de crescimento exponencial (COUTTE et al., 2010) ou ainda, entrando na fase estacionária de crescimento celular (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; ABAS et al., 2013; SEYDLOVÁ et al., 2013).

As estequiometrias dos ensaios realizados seriam interessantes para a melhor compreensão do processo. Porém, devido a falta de metodologia adequada para a determinação dos outros produtos da reação (demais ácidos formados) não foi possível quantificá-los, desta forma, as equações estequiométricas não foram apresentadas.

Com o objetivo de sumarizar os principais resultados cinéticos obtidos em cada ensaio realizado construiu-se a Tabela 7.1, conforme mostrado no Apêndice.

4.3 Caracterização e estabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ATCC 21332

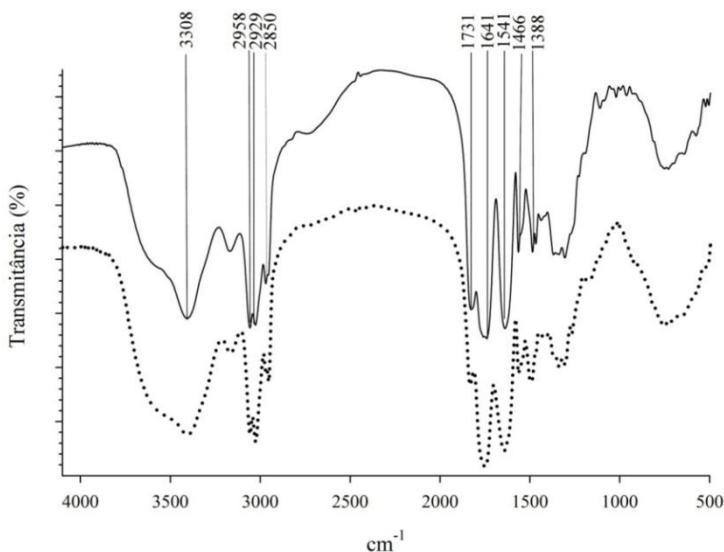
4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para a identificação pela caracterização dos grupamentos funcionais do biossurfactante produzido e recuperado após cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332. A Figura 4.30 apresenta os espectros de FTIR do biossurfactante produzido e da amostra de surfactina padrão, onde picos característicos de surfactina podem ser observados para a amostra recuperada e confirmados a partir dos picos do espectro da amostra de surfactina padrão. As bandas de absorção encontradas na amostra foram praticamente iguais ao padrão e serão apresentadas a seguir.

Foi possível observar a banda em 3308 cm^{-1} , resultante do estiramento da ligação N-H presente em peptídeos (PEREIRA et al., 2013; BEZZA; CHIRWA, 2015; ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015). Segundo Joshi, Bharucha e Desai (2008), bandas em torno de $2956\text{ a }2924\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento assimétrico da ligação C-H de grupamento CH_3 . Na amostra analisada, estes valores foram de $2958\text{ a }2929\text{ cm}^{-1}$. A absorção em 2850 cm^{-1} foi

observada e corresponde ao estiramento da ligação C-H de grupamento CH_2 indicando a presença de uma cadeia alifática no composto semipurificado (JOSHI; BHARUCHA; DESAI, 2008; FELIX, 2012; ISMAIL et al., 2013; PEREIRA et al., 2013).

Figura 4.30 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da surfactina padrão ((Sigma-Aldrich, pureza > 98 %) (—) e do biossurfactante semipurificado (·····) produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio D, em 32 °C a 300 rpm.



A banda em 1731 cm^{-1} está associada à absorção do grupo carbonila presente na lactona e o estiramento da ligação N-CO pode ser representado pela banda de absorção em 1641 cm^{-1} (AMANI^a et al., 2010; ISMAIL et al., 2013; AL-WAHAIBI et al., 2014). Além disso, a absorção na região $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ é característica de amida I em proteínas (BEZZA; CHIRWA, 2015), indicando, assim, a presença de grupos de peptídeos no biossurfactante. Segundo De Faria et al. (2011) e Pereira et al. (2013), a banda em 1541 cm^{-1} representa a deformação angular da ligação N-H combinado com o estiramento da ligação C-N. A presença de cadeias alifáticas de grupamento CH_3 e CH_2 estão

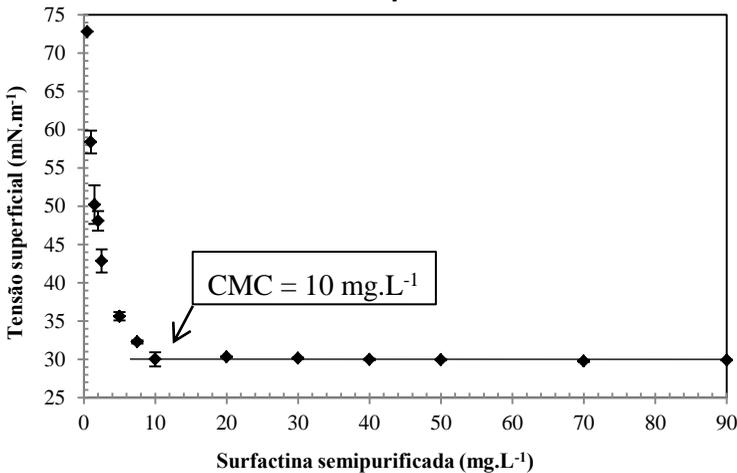
representadas pelas bandas de absorção em 1466 a 1388 cm^{-1} (AMANI^a et al., 2010; ISMAIL et al., 2013; AL-WAHAIBI et al., 2014; BEZZA; CHIRWA, 2015).

Na Figura 4.30 nota-se que todos os padrões de absorção da amostra semipurificada mostraram-se idênticos aos da surfactina padrão. Esta semelhança confirma que o biossurfactante produzido a partir do cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 apresenta uma porção alifática e um grupo peptídico, concluindo-se que se trata do lipopeptídeo surfactina.

4.3.2 Tensão superficial, interfacial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Uma das propriedades mais importantes dos tensoativos é sua eficiência quanto à redução da tensão, seja ela superficial ou interfacial e a concentração micelar crítica (CMC) é um índice largamente utilizado para avaliar essa atividade surfactante (MEDEIROS, 2007). Os valores de tensão superficial das diluições seriadas utilizadas para a determinação da CMC de uma solução de 1 g.L^{-1} do biossurfactante semipurificado estão apresentados na Figura 4.31.

Figura 4.31 Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina semipurificada produzida por *B. subtilis* ATCC 21332 no ensaio D a 32 °C e 300 rpm.



Observa-se na Figura 4.31 que o aumento na concentração do biossurfactante produzido provocou diminuição gradativa da tensão superficial da água destilada até o ponto na qual a CMC foi atingida, ou seja, 10 mg.L^{-1} . A partir deste ponto, mesmo com o aumento da concentração de surfactina, não houve redução adicional na tensão superficial.

O biossurfactante produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, já que com apenas 10 mg.L^{-1} este foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $72,0 \pm 0,1$ para $29,9 \pm 0,1 \text{ mN.m}^{-1}$ (Figura 4.31) e a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de $32,5$ para $3,0 \pm 0,2 \text{ mN.m}^{-1}$, provocando reduções de 58,5 e 90,8 %, respectivamente.

A surfactina produzida neste trabalho demonstrou maior capacidade de redução da tensão superficial do que a dos biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* em estudos realizados por Gudiña et al. (2012) e por Kim et al. (1997), obtendo concentrações micelares críticas de 20 e 40 mg.L^{-1} , respectivamente. No entanto, resultados reportados por Costa (2005) e De Oliveira et al. (2013) apresentaram CMC igual a 10 mg.L^{-1} e por Barros, Quadros e Pastore (2008) e Felix (2012) foram relatados valores de CMC em torno de 12 e $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Os trabalhos relatados acima apresentaram valores iguais ou próximos ao obtido no presente estudo. A CMC de 10 mg.L^{-1} encontra-se menor a $12,4 \text{ mg.L}^{-1}$, obtida no recente estudo desenvolvido por Huang et al. (2015), cultivando *B. subtilis* ATCC 21332. Na CMC esses autores obtiveram tensão superficial mínima da água de $33,2 \text{ mN.m}^{-1}$. Os resultados mostraram que não somente a CMC no presente estudo foi menor, mas também a redução da tensão superficial da água.

No presente estudo, o valor da tensão interfacial contra n-hexadecano, $3,0 \text{ mN.m}^{-1}$, foi inferior ao encontrado por Al-Bahry et al. (2013) e Al-Wahaibi et al. (2014), no qual o biossurfactante produzido por *B. subtilis* B20 e por *B. subtilis* B30 foi capaz de reduzir a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de $27,0$ para $5,0 \text{ mN.m}^{-1}$ e de $29,0$ para $3,6 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente. No entanto, um valor menor de tensão interfacial ao encontrado neste estudo foi relatado por Felix (2012), onde a surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI005 foi capaz de reduzir a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de $27,0$ para $2,0 \text{ mN.m}^{-1}$.

A partir dos dados relacionados é possível afirmar que a surfactina produzida apresentou grande atividade superficial e baixa CMC, propriedades estas que a caracterizam como um potencial agente tensoativo. Ainda de acordo com Bognolo (1999) quanto menor o valor da CMC mais eficiente será o biossurfactante, sendo assim, a surfactina produzida apresenta características desejáveis para aplicação industrial. Vale ressaltar que o valor da CMC depende da natureza do solvente que é empregado para solubilizar a surfactina bem como a pureza da surfactina utilizada (FOX; BALA, 2000), além da composição do meio de cultura, das condições de cultivo e da cepa produtora (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

4.3.3 Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão em diferentes hidrocarbonetos

A estabilidade de uma emulsão óleo/água ou água/óleo é normalmente utilizada como um indicador da atividade superficial (VAN DYKE et al., 1993). Na Figura 4.32 está apresentado o índice de emulsificação (IE_{24}) do biossurfactante produzido e do surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS), um importante surfactante químico comercial. A Figura 4.33 apresenta uma ilustração das emulsões (IE_{24}) da solução de 1 g.L^{-1} de biossurfactante de *B. subtilis* ATCC 21332 com diferentes hidrocarbonetos.

Figura 4.32 Índice de emulsificação (IE_{24}) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com o biossurfactante de *B. subtilis* ATCC 21332 (□) e o surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS) (■).

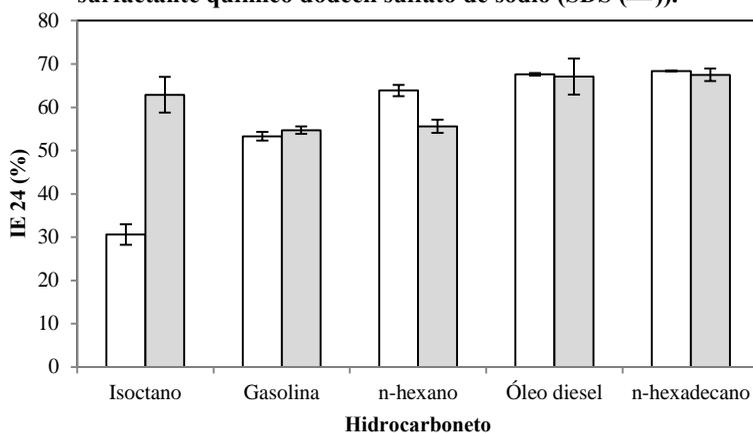
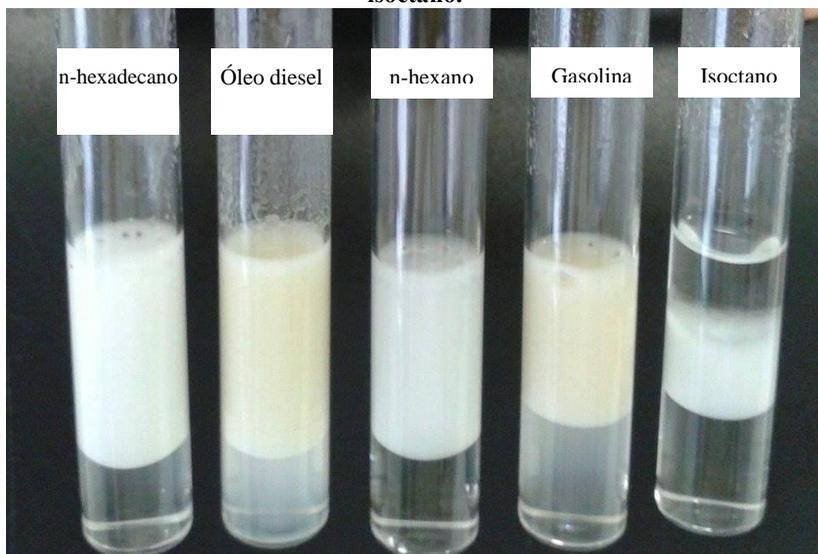


Figura 4.33 Ilustração das emulsões (IE_{24}) da solução de 1 g.L^{-1} de biossurfactante de *B. subtilis* ATCC 21332 com diferentes hidrocarbonetos: (da esquerda para direita) n-hexadecano, óleo diesel, n-hexano, gasolina e isoctano.



Em função de sua atividade emulsificante, a surfactina quando em contato com 2 líquidos imiscíveis reduz a tensão interfacial das fases, permitindo portanto, que elas se misturem, formando assim uma emulsão (ARAÚJO, 2001). Dessa forma, observam-se na Figura 4.33 as emulsões formadas entre a solução de surfactina e os diferentes hidrocarbonetos. A parte superior da mistura, exceto para o isoctano, compreende a fase emulsificada entre a água, o biossurfactante e o respectivo hidrocarboneto e na parte inferior encontra-se a água remanescente. Este tipo de emulsão, na qual a água está em excesso, indica que o biossurfactante é mais solúvel em óleo e que a emulsão formada é do tipo água/óleo (gotículas de água são inseridas em um sistema onde o óleo é a fase contínua). De acordo com Daltin (2011) nas emulsões água/óleo as gotículas de óleo são recobertas de moléculas de biossurfactante e estas são chamadas de micelas em óleo. O excesso de água, como pode ser visto na Figura 4.33, sugere que não há micelas de biossurfactante em óleo suficientes para solubilizar toda a água, gerando assim um sistema de duas fases, no qual, a fase de microemulsão é chamada de Winsor tipo II (DALTIM, 2011). No caso da emulsão em isoctano (Figura 4.33), nota-se que esta se apresenta diferente das demais, na qual a emulsão formada encontra-se no meio e apresenta água e óleo em excesso. Segundo Daltin (2011), neste caso, as forças de interação entre biossurfactante-água e biossurfactante-óleo são muito semelhantes e a microemulsão é classificada de Winsor tipo III. Nesta microemulsão as micelas são organizadas em um sistema bicontínuo, tanto na fase água como na fase óleo e, portanto, não há a identificação de uma fase contínua e uma fase descontínua, como nas demais emulsões formadas.

Observa-se na Figura 4.32 que tanto o biossurfactante, com exceção da emulsão em isoctano, quanto o surfactante SDS foram capazes de formar emulsões estáveis em diferentes hidrocarbonetos, após 24 h a sua formação. O biossurfactante em estudo apresentou alta capacidade para estabilizar emulsões com óleo diesel e n-hexadecano ao longo de 24 h, comprovado pelos altos índices de emulsificação obtidos (67,6 e 68,4 %, respectivamente), sendo que com n-hexano o IE_{24} foi ligeiramente inferior, apresentando valor de 63,9 %. O índice de emulsificação com gasolina foi de 53,3 % e o menor valor foi verificado na presença de isoctano, onde o IE_{24} foi de somente 30,6 %. Nota-se que tanto para o biossurfactante quanto para o surfactante SDS, os melhores

índices de emulsificação foram obtidos utilizando n-hexadecano e óleo diesel.

Felix (2012) estudou a capacidade emulsificante de uma solução de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de surfactina semipurificada produzida por *B. subtilis* LAMI005 em diferentes hidrocarbonetos. O IE₂₄ em óleo diesel foi de 67,5 %, em n-hexadecano 68,6 % e em gasolina 55,2 %. Da mesma forma, a partir de uma solução de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada produzida por *B. subtilis* foram encontrados valores de IE₂₄ em n-hexadecano de 69 % (NITSCHKE; PASTORE, 2006) e 68 % (GONG et al., 2009) e em hexano de 67,7 % (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008) e 66,6 % (NITSCHKE; PASTORE, 2006). Os valores encontrados no presente trabalho estão em concordância com os resultados reportados pelos autores citados.

No trabalho desenvolvido por Abu-Ruwaida et al. (1991), o biossurfactante obtido a partir de *Rhodococcus* ST-5 apresentou menor índice de emulsificação frente a hidrocarbonetos de cadeia curta do que para os hidrocarbonetos de cadeia longa. No entanto, de acordo com Costa (2005) e Nitschke e Pastore (2006), a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *B. subtilis* LB5a não parece estar relacionada ao tamanho da cadeia carbônica, já que altos teores de emulsões estáveis foram encontradas, independentemente da extensão da cadeia. Comportamento semelhante foi observado no presente estudo, onde a surfactina produzida por *B. subtilis* ATCC 21332 não revelou especificidade quanto ao tamanho da cadeia, já que o IE₂₄ do biossurfactante + isoctano (8 carbonos) foi duas vezes menor que o IE₂₄ do biossurfactante + n-hexano (6 carbonos).

Na Tabela 4.6 encontram-se os valores do índice de emulsificação e estabilidade da emulsão para o biossurfactante produzido e para o surfactante SDS, no período de até 96 h. Nota-se que os valores do índice de emulsificação entre o biossurfactante (BS) e o surfactante SDS foram semelhantes para todos os hidrocarbonetos testados no período de 24 h (IE₂₄), exceto quando se utilizou isoctano. Na presença de n-hexano o biossurfactante (BS) exibiu melhor resultado que o surfactante SDS, apresentando relação IE₂₄SDS/IE₂₄BS de 0,87. No entanto, o contrário foi observado utilizando isoctano o qual a relação IE₂₄SDS/IE₂₄BS foi de 2,06.

Tabela 4.6 Índice de emulsificação (IE) e estabilidade da emulsão (EE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com o biossurfactante semipurificado de *B. subtilis* ATCC 21332 (BS) e o surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS).

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	IE ₂₄ (%)	SDS/ BS	IE ₄₈ (%)	EE ₄₈ (%)	IE ₇₂ (%)	EE ₇₂ (%)	IE ₉₆ (%)	EE ₉₆ (%)
n-hexano + BS	63,9 ± 1,3	0,87	63,9 ± 1,3	100	63,9 ± 1,3	100	63,9 ± 1,3	100
n-hexano + SDS	55,6 ± 1,5		50,0 ± 1,8	89,9	50,0 ± 1,8	89,9	50,0 ± 1,8	89,9
Óleo diesel + BS	67,6 ± 1,3	0,99	67,6 ± 1,3	100	67,6 ± 1,3	100	67,6 ± 1,3	100
Óleo diesel + SDS	67,1 ± 4,2		65,8 ± 3,4	98,0	65,8 ± 3,4	98,0	64,5 ± 3,3	96,1
n-hexadecano + BS	68,4 ± 0,1	0,99	67,8 ± 0,9	99,1	65,8 ± 0,1	96,2	65,8 ± 0,1	96,2
n-hexadecano + SDS	67,5 ± 1,4		67,5 ± 1,4	100	67,5 ± 1,4	100	66,7 ± 1,8	98,8
Gasolina+ BS	53,3 ± 1,0	1,02	52,7 ± 1,9	98,9	51,7 ± 0,5	96,9	51,0 ± 1,5	95,7
Gasolina + SDS	54,7 ± 0,9		54,7 ± 0,9	100	54,1 ± 0,1	98,9	53,4 ± 0,9	98,7
Isoctano + BS	30,6 ± 2,4	2,06	30,6 ± 2,4	100	30,6 ± 2,4	100	30,6 ± 2,4	100
Isoctano + SDS	62,9 ± 4,1		62,9 ± 4,1	100	54,3 ± 4,4	86,3	50,0 ± 4,0	79,5

No que diz respeito à estabilidade da emulsão (EE), no período analisado entre 24 e 96 h, nota-se que as emulsões com o biossurfactante apresentaram alta estabilidade, evidenciado pelos elevados valores de EE_{96} que ficaram entre 95,7 e 100 %. As emulsões formadas com n-hexano, óleo diesel e isoctano não sofreram variações no índice de emulsificação e apresentaram 100 % de estabilidade ao final das 96 h. Já o n-hexadecano apresentou EE_{96} de 96,2 % e a gasolina foi a que apresentou a menor EE_{96} com 95,7 %. Quando o surfactante SDS foi testado os melhores resultados foram obtidos com n-hexadecano e gasolina, apresentando EE_{96} de 98,8 e 98,7 %, respectivamente.

Barros, Quadros e Pastore (2008) avaliaram a EE de uma solução de 1 g.L^{-1} de biossurfactante semipurificado por 96 h. A EE_{96} foi equivalente a 90 % com hexano, 98,3 % com octano, 98,1 % com gasolina e 23,5 % com óleo diesel. Os resultados obtidos no estudo realizado corroboram com os acima citados, com exceção da EE_{96} com óleo diesel, onde o resultado obtido foi melhor e mais estável. A EE_{96} com óleo diesel (100 %) foi semelhante e pode ser comparada à estabilidade de 98 %, em 72 h (COSTA, 2005), de 100 %, em 72 h (DE FARIA, 2010) e de 98,2 %, em 96 h (FELIX, 2012). A estabilidade da emulsão durante 168 h, de uma solução de 5 g.L^{-1} de biossurfactante purificado obtido a partir do cultivo de *B. amyloliquefaciens* An6, utilizando glicose como fonte de carbono, ficou em torno de 88,2 e 100 % com n-hexadecano e óleo diesel, respectivamente (AYED et al., 2015).

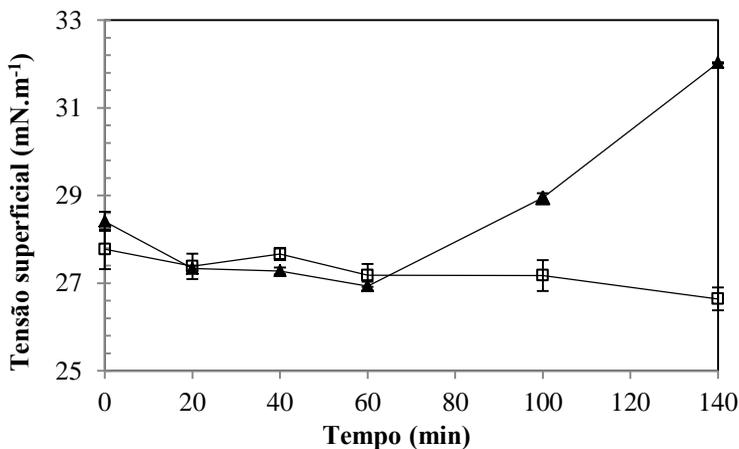
Nota-se na Tabela 4.6 que comparativamente ao surfactante SDS, na maior parte das vezes, o biossurfactante apresentou maior estabilidade emulsificante frente aos hidrocarbonetos testados. Estes resultados sugerem que, nas condições experimentais, a surfactina obtida por *B. subtilis* ATCC 21332 apresentou um desempenho semelhante em comparação com SDS, um importante surfactante químico comercial. A habilidade de formar emulsões com hidrocarbonetos apontam que a surfactina tem relevância para várias aplicações industriais, visto que a capacidade de emulsificação indica o potencial que o biossurfactante apresenta para o uso em biorremediação de áreas contaminadas através do aumento da biodisponibilidade de contaminantes (RON; ROSENBERG, 2001). Além disso, o uso de biossurfactantes capazes de estabilizar emulsões implica em sua

utilização na recuperação avançada de petróleo (MEOR), na remoção de óleo retido nas borras oleosas (BANAT, 1995), entre outros.

4.3.4 Estudo da estabilidade do biossurfactante

A preservação da estabilidade sob condições adversas é um importante atributo para as substâncias tensoativas pois, de acordo com Al-Wahaibi et al. (2014), o uso do biossurfactante parcialmente purificado na MEOR *ex situ* requer que o biossurfactante seja estável dentro de uma faixa de alta temperatura (cerca de 50-80 °C), ampla faixa de pH e alta concentração salina, para assegurar a vasta aplicabilidade na recuperação de petróleo. A estabilidade da solução de 1 g.L⁻¹ do biossurfactante semipurificado produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 e da mesma solução diluída 100 vezes, denominada de diluição micelar crítica (DMC⁻²) foi avaliada frente a variações de pH, força iônica e tempo de exposição a elevada temperatura, através de medidas da tensão superficial (TS). A Figura 4.34 apresenta os resultados obtidos quando se avaliou o efeito do tratamento térmico em diferentes intervalos de tempo.

Figura 4.34 Efeito do tratamento térmico a 100 °C em diferentes tempos de exposição nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L⁻¹ do biossurfactante semipurificado produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 (□) e da mesma solução diluída 100 vezes (DMC⁻²) (▲).



Observa-se que mesmo havendo pequenas oscilações entre os valores de tensão superficial do biossurfactante na concentração de 1 g.L^{-1} , o tratamento térmico não influenciou significativamente ($p > 0,05$), pois a tensão manteve-se praticamente constante mesmo após 2 h de exposição a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Porém, a amostra diluída 100 vezes (DMC^{-2}) apresentou um aumento gradual no valor da tensão superficial à medida que os tempos de exposição foram superiores a 60 min. Até 60 min de exposição, a tensão permaneceu estável sendo que o valor encontrava-se em torno de 27 mN.m^{-1} e, em seguida, aumentou significativamente ($p < 0,05$) para valores próximos a 29 e 32 mN.m^{-1} nos tempos de 100 e 140 min, respectivamente.

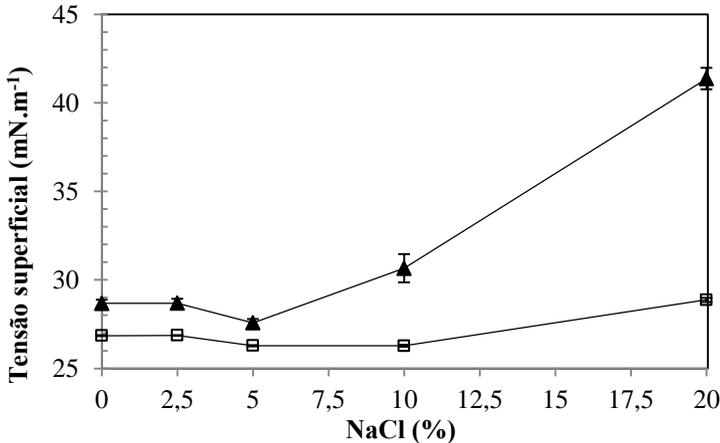
Essa diferença de comportamento entre as amostras pode ser explicada pela concentração de surfactina presente em cada solução, pois na DMC^{-2} a concentração diminui para 10 mg.L^{-1} , encontrando-se próxima ou abaixo da CMC. Nessa condição qualquer alteração no sistema pode afetar as propriedades funcionais do biossurfactante, uma vez que concentrações abaixo da CMC causam grandes aumentos na tensão superficial (SLIVINSKI, 2012). De acordo com Barros, Quadros e Pastore (2008), o valor de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada não apresentou variação significativa na temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 140 min. Todavia, foram verificadas oscilações nos valores de tensão da solução na DMC^{-2} , observado por um leve aumento nos tratamentos de 100 e 140 min, no qual os autores atribuíram a variações experimentais.

A estabilidade térmica de uma solução de 100 mg.L^{-1} de surfactina semipurificada produzida por *B. subtilis* E8 foi investigada durante um período de 12 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados mostraram que o tempo de exposição de até 12 h não provocou nenhuma interferência na tensão superficial (GONG et al., 2009). Além disso, Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008) verificaram a estabilidade de uma solução de 50 mg.L^{-1} de biossurfactante produzido por *B. subtilis* BS5 e constataram que não houve redução na tensão superficial após 60 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a solução de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada obtida por *B. subtilis* ATCC 21332 apresentou boa estabilidade térmica, pois não houve aumento da tensão superficial nos tempos e temperatura estudados.

A Figura 4.35 apresenta os resultados do efeito da adição de NaCl, em concentrações variando de 0 a 20 % na tensão superficial.

Figura 4.35 Efeito da salinidade nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} do biosurfactante semipurificado produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 (\square) e da mesma solução diluída 100 vezes (DMC⁻²) (\blacktriangle).



Nota-se na Figura 4.35 que a adição de até 10 % (m/v) de NaCl na solução de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada não provocou alterações na tensão superficial, mantendo-se em torno de $26,3 \text{ mN.m}^{-1}$. No entanto, esse valor aumentou significativamente ($p < 0,05$) para $28,9 \text{ mN.m}^{-1}$ quando a concentração alcançou 20 % de NaCl. A solução na DMC⁻² permaneceu estável até 5 % de NaCl, apresentando tensão superficial de $27,5 \text{ mN.m}^{-1}$, sendo que este valor aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando a concentração salina atingiu 10 e 20 % de NaCl, chegando a valores de $30,6$ e $41,4 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente. Para ambas as soluções os valores de tensão superficial aumentaram com concentração salina acima de 10 % de NaCl, indicando que a surfactina apresentava-se menos solúvel. Segundo Araújo (2001) alguns aminoácidos são prontamente *salted-out* e tem sua solubilidade diminuída com o aumento da concentração salina. Silva e Silva (2010) relataram que a molécula de surfactina em meio aquoso

liga-se com as moléculas de água formando uma camada de água ao seu redor sendo que o mesmo procedimento é feito pelo sal. Dessa forma, o aumento da concentração de NaCl na solução faz com que a surfactina e os íons salinos tenham que competir pelas moléculas de água, como o sal possui força iônica maior, a surfactina perde sua camada aquosa e, assim, ocorre a agregação das moléculas seguida pela precipitação. Knoblich et al. (1995) observaram mudanças no tamanho e na forma das micelas de surfactina relativo à adição de NaCl. Micelas globulares e cilíndricas quando em presença de NaCl foram transformadas em pequenas micelas esféricas, as quais estão associadas com a diminuição de peso e um aumento no número de agregação micelar, devido ao efeito *salted-out*.

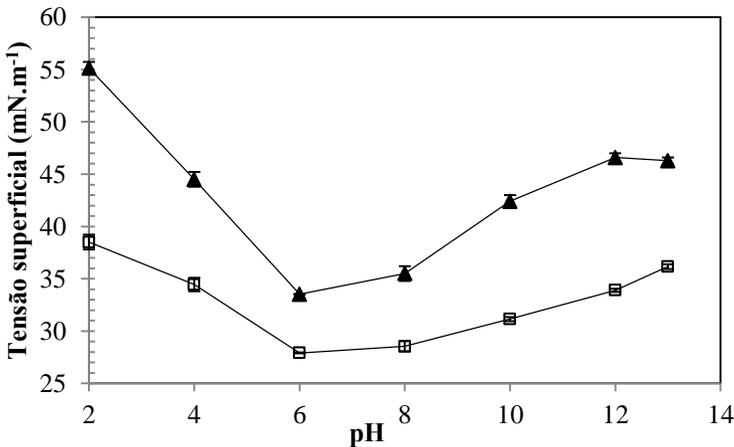
Barros, Quadros e Pastore (2008) reportaram que os valores de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} de surfactina e da solução na DMC^{-2} não foram alterados na presença de até 20 % de NaCl, ficando próximos a 27 e 36 mN.m^{-1} , respectivamente. Khopade et al. (2012) investigaram a estabilidade do biosurfactante produzido por *Streptomyces* B3 e reportaram que a tensão superficial manteve-se constante até 6 % de NaCl, sendo que o aumento na concentração salina de 6 até 9 % de NaCl, provocou um acréscimo de 20 % na tensão superficial, resultando em um valor em torno de 32 mN.m^{-1} . Embora no presente estudo os resultados de tensão superficial tenham apresentado instabilidade com elevada salinidade, pode-se notar que os valores de $28,9 \text{ mN.m}^{-1}$ (solução 1 g.L^{-1}) e $41,4 \text{ mN.m}^{-1}$ (solução na DMC^{-2}) na concentração salina de 20 % de NaCl, encontram-se próximos aos relatados na literatura.

Ainda sobra a Figura 4.35, ao comparar os valores de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} de surfactina com a solução na DMC^{-2} , percebe-se que os valores na DMC^{-2} foram ligeiramente maiores em baixa concentração salina (até 5 % de NaCl). Contudo, essa diferença fica mais evidente com concentrações salinas acima de 5 % de NaCl, mostrando maior influência da alta salinidade na solução com menor concentração de surfactina. Maior instabilidade da amostra na DMC^{-2} já tinha sido observada quando a mesma foi exposta por longo período em alta temperatura. Assim, pode-se dizer que na DMC^{-2} a tensão superficial é mais afetada devido à concentração de surfactina encontrar-se próxima ou abaixo da CMC.

De acordo com Khopade et al. (2012) a estabilidade do biossurfactante em ambientes com alta salinidade, até 9 % de NaCl, confere a utilização deste em processos de biorremediação de ambientes marinhos. Ambientes salinos também são encontrados nos processos de recuperação avançada de petróleo, onde a concentração salina encontra-se por volta de 3,5 % (m/v), onde 50 % corresponde ao NaCl (SLIVINSKI, 2012). Dessa forma, é desejável que os surfactantes sejam estáveis nessas condições. Segundo Bognolo (1999) os biossurfactantes normalmente apresentam-se ativos em concentrações de até 10 % de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2 - 3 % é suficiente para inativar os surfactantes convencionais. Neste sentido, a estabilidade da solução de 1 g.L^{-1} de surfactina na concentração salina de 10 % de NaCl apresenta-se como um resultado satisfatório.

A estabilidade do biossurfactante produzido em relação à variação do pH, é mostrado na Figura 4.36.

Figura 4.36 Efeito da variação do pH nas medidas de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} do biossurfactante semipurificado produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 (\square) e da mesma solução diluída 100 vezes (\blacktriangle).



Avaliando-se os valores de tensão superficial da solução de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada, observou-se que os menores

valores, 27,9 e 28,5 mN.m⁻¹, correspondem aos pH 6 e 8, respectivamente. Para valores de pH 2 e 4 houve um aumento brusco ($p < 0,05$) nos valores de tensão superficial e também observou-se que as amostras ficaram turvas, tal fato se deve, provavelmente, à precipitação da surfactina em meio ácido (COOPER et al., 1981). Observa-se um aumento gradual, porém significativo ($p < 0,05$), nos valores de tensão superficial para valores de pH 8 até pH 13, quando a tensão superficial atingiu valor de 36,2 mN.m⁻¹. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Vaz et al. (2012), onde a solução de 1 g.L⁻¹ de surfactina apresentou valor de tensão superficial mínima de 29,9 mN.m⁻¹ em pH 6. Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008) verificaram que a solução de 50 mg.L⁻¹ de surfactina não apresentou nenhuma atividade de superfície nos valores de pH 2 e 4, sendo que o início da atividade foi detectado a partir de pH 5, com a máxima atividade em pH 6, correspondendo a tensão superficial de 32 mN.m⁻¹. Os autores concluíram que a surfactina é geralmente mais ativa em pHs próximos da neutralidade e que condições de pH altamente ácido causam maior redução da atividade superficial do que pH altamente alcalino, corroborando com o comportamento obtido no presente estudo (Figura 4.36). Adicionalmente, em um teste de solubilidade observou-se que a surfactina apresenta solubilidade aquosa ótima em pH alcalino (pH 8-8,5). Este fenômeno foi atribuído à natureza ácida de surfactina, pois a molécula contém dois grupos carboxílicos, um que corresponde a um resíduo de ácido glutâmico e o outro de um resíduo de ácido aspártico da fração peptídica do lipopeptídeo, os quais conferem a natureza aniônica da surfactina (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFa; HASSOUNA, 2008).

Observa-se na Figura 4.36 um comportamento semelhante quando as soluções, na concentração de 1 g.L⁻¹ de surfactina e na DMC⁻², foram submetidas a pH ácido e básico, pois nas duas soluções os valores de tensão superficial foram mínimos e iguais estatisticamente ($p > 0,05$) entre pH 6 e 8. Porém, comparativamente a solução de 1 g.L⁻¹ de surfactina a solução na DMC⁻² apresentou maiores acréscimos nos valores de tensão superficial. Esse comportamento já foi reportado por outros autores (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008; SLIVINSKI, 2012) e justificado pelo fato da concentração estar próxima ou abaixo da CMC implicando que para qualquer redução da concentração de

surfactina, em função da precipitação, por exemplo, haverá um grande impacto na variação da tensão superficial.

As propriedades da surfactina são dependentes dos valores de pH, pois uma solução de surfactina quando submetida a pH ácido (2,0) teve o valor da tensão superficial elevado para 62 mN.m^{-1} , e após a mesma ser neutralizada (pH 6,0) o valor de tensão superficial retornou para 27 mN.m^{-1} . Este comportamento se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada (COOPER et al., 1981).

5 CONCLUSÕES

Bacillus subtilis ATCC 21332 foi capaz de crescer e produzir surfactina em anaerobiose e aerobiose, neste último utilizando nitrato como aceptor final de elétrons em meio de cultivo baseado na composição salina da água do mar.

O estudo da influência da relação carbono-nitrogênio (C/N) sobre a produtividade em surfactina revelou que a relação C/N 3,6 foi a mais adequada, resultando em uma produtividade de $2,49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

O aumento proporcional das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio no meio mineral (MM) não teve efeito positivo, acarretando em menor produtividade em surfactina.

A avaliação dos meios MM1 e MM2 revelou que o meio MM2, o qual foi adicionado de micronutrientes e suplementado de extrato de levedura, foi o mais indicado para a síntese de surfactina a partir de 20 g.L^{-1} de glicose, resultando em uma produtividade de $3,39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ressaltando que esta foi a produtividade máxima em surfactina.

O aumento na concentração inicial de 20 g.L^{-1} para 30 g.L^{-1} de glicose utilizando o meio MM2, resultou maior produção de surfactina, porém houve diminuição na produtividade. Com relação ao aumento de 30 g.L^{-1} para 40 g.L^{-1} de glicose no MM2, os resultados foram considerados insatisfatórios, apresentando queda tanto na produção quanto na produtividade em surfactina.

Mediante a análise de FTIR, o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ATCC 21332 em anaerobiose foi identificado como o lipopeptídeo do tipo surfactina.

A surfactina semipurificada apresentou CMC de 10 mg.L^{-1} e foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $72,0$ para $29,9 \text{ mN.m}^{-1}$ caracterizando-se assim, como um biossurfactante efetivo e eficaz.

A solução aquosa de 1 g.L^{-1} de surfactina semipurificada apresentou excelente capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões formadas. Destacando-se o índice de emulsificação de $68,4 \%$ em n-hexadecano com estabilidade de $96,2 \%$ por até 96 h . A solução aquosa também mostrou estabilidade na faixa de pH entre 6 e 8 , salinidade de até 10% de NaCl e tempo de exposição de 140 min na temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Adaptação do inóculo em condição anaeróbia utilizando nitrato como acceptor final de elétrons.
- Realizar cultivos em biorreator descontínuo alimentado, visando verificar o aumento na produtividade em surfactina.
- Quantificar todos os produtos formados durante os cultivos a fim de tornar possível o desenvolvimento das reações estequiométricas.
- Avaliar a aplicação do biossurfactante na recuperação de petróleo, a partir da injeção da surfactina em colunas empacotadas com areia e saturadas com óleo.
- Caracterizar as isoformas e os homólogos da surfactina produzida em anaerobiose, por meio de análises de Espectrometria de Massa e Espectrometria de Ressonância Magnética.
- Avaliar as propriedades antimicrobiana e antiadesiva da surfactina.

7 REFERÊNCIAS

ABAS, M.R.; KADER, A.J.A.; KHALIL, M.S.; HAMID, A.A.; ISA, M.H.M. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as Fermentation Media. In: **International Conference on Food and Agricultural Sciences, Singapore**, v. 55, 2013.

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFI, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 289-303, 2008.

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A. KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotechnology**, v. 11, p. 315-324, 1991.

AL-BAHRY, N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 80, p. 141-146, 2013.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324– 333, 2014.

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^a.

AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. **Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications**. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 75, p. 209-214, 2010^b.

ANTÔNIO, R.V.; REGINATTO, V. Energética e Metabolismo. In: Schmidell, W.; Soares, H.M.; Etchebehere, C.; Menes, R.J.; Bertola, N.C.; Contreras, E.M. **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Florianópolis: CNPq, 2007, pp. 149-174.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; HEGDE, S. Isolation, screening and production of biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 49-56, 2012.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos. Teoria e Prática**. 2.ed. – Viçosa: UFV, 2001, 416 p.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline lipopeptídeo surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.

AYED, H.B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUDH, A.; HMIDET, N. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p 8-14, 2015.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, M.G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 01-14, 2007.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 979-985, 2008.

BENCE, K. **Bacterial production of antimicrobial biosurfactants by *Bacillus subtilis***. 2011. Thesis (Master of Science Engineering) – Chemical Engineering, University of Stellenbosch.

BERBERT-MOLINA, M.A.; PRATA, A.M.R.; PESSANHA, L.G.; SILVEIRA, M.M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1397-1404, 2008.

BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M.N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v.101, p. 168–178, 2015.

BLENCKE, H.M.; HOMUTH, G.; LUDWIG, H.; MÄDER, U.; HECKER, M.; STÜLKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metabolic Engineering**, v. 5, p.133-149, 2003.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloid Surface**, v. 52, p 41–52, 1999.

BROWN, L.R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.1-5, 2010.

BROWN, L. R.; VADIE, A. A.; STEPHENS, J. O. Slowing production decline and extending the economic life of an oil field: new MEOR technology. **SPE Reservoir Evaluation and Engineering**, v. 5, p. 33-41, 2002.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520–529, 1999.

CHEN, C.-Y.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n.12, p. 1923-1931, 2006.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias** – Vol. 5 – Reatores Anaeróbios. Belo Horizonte: Segrac, 1997, 246 p.

CLARK, J.B.; MUNNECKE, D.M.; JENNEMAN, G.E. 1981. *In situ* microbial enhancement of oil production. **Developments Industrial Microbiology**, v. 22, p. 695-701, 1981.

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 Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412, 1981.

COSTA, G.A.N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

COSTA, S.G.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483- 488, 2006.

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; YAHIA, S.A; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, F.; DHULSTER, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor, **Applied Environmental Microbiology**, v. 87, p. 499-507, 2010.

CRASTO, C.J.T.L. **Avaliação da produção de ramnolipídios por bactérias isoladas de poços de petróleo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos.

CUBITTO, M.A.; MORÁN, A.C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M.N.; BALDINI, M.D.; SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281-287, 2004.

DALTIN, D. Tensoativos – Química, Propriedades e Aplicações. Editora Blucher, São Paulo, 2011.

DAS, S.; SEN, R. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK-02 vis-à-vis other Bacilli. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9659-9667, 2011.

DASTGHEIB, S.M.M.; AMOOZEGAR, E.M.S.; ELAHI, E.E.; ASAD, E.S.; BANAT, E.I.M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 263–270, 2008.

DAUD, F.N.; YAHYA, A.; SALLEH, M.M.; SUHAIMI, N.; XUAN, C.H. Production of Biosurfactant by Locally Isolated Thermophilic Facultatively Anaerobic Bacteria strain B160. In: **KUSTEM 5th Annual Seminar on Sustainability Science and Management, KUSTEM, K. Terengganu** (2 – 3 May), 2006.

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.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology*. v. 61, p. 47- 64. 1997.

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. **Biosurfactants Production, Properties, Applications** (ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 65-97, 1993.

DE FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

DE FARIA, A.F.; TEODORO-MARTINEZ, D.S.; DE OLIVEIRA, G.N.; GONTIJO, B.; SERRANO Í.; GARCIA, J.S.; TÓTOLA, M.R.; EBERLIN, M.N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, 2011.

DE LIMA JUNIOR, G.A. **Obtenção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFP, Curitiba.

DE OLIVEIRA, D.W.F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. 2010. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará.

DE OLIVEIRA, D.W.F.; FRANÇA, I.W.L.; FÉLIX, A.K.N.; MARTINS, J.J.L.; GIROA, M.E.A.; MELO, V.M.M., GONÇALVES, L.R.B. 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.

DE SOUSA, J.R. **Produção de biossurfactantes a partir do glicerol obtido do processo de produção de biodiesel por *Pseudomonas aeruginosa* LAMI**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFC, Fortaleza.

DE SOUSA, J.R. **Produção de lipopeptídeos a partir da bioconversão do co-produto da produção de biodiesel**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DEUTSCHER, J.; GALINIER, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. **Carbohydrate uptake and metabolism**. In: Sonenshein, A.L.; Hoch,

J.A.; Losick, R. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. Washington: ASM, 2002.

ELAZZAZY, A.M.; ABDELMONEIM, T.S.; ALMAGHRABI, O.A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**. in press doi: 10.1016/j.sjbs.2014.11.018, 2015.

FAHIM, S; DIMITROV, 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.

FELIX, A.K.N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFC, Fortaleza.

FERNANDES, P.F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. em condição anaeróbia**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa.

FOLMSBEE, M.; DUNCAN.; HAN, S.O.; NAGLE, D.; JENNINGS, E.; McINERNEY, M. Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojaviensis* strain JF-2. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 645-649, 2006.

FONSECA, R.R.; SILVA, A.J.R.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L.; SÉRVULO, E.F.C. Optimizing Carbon/Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, 2007.

FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANCY, D.S.; THOMAS, J.M.; RAYMOND, R.L.; WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industry Microbiology**, n. 8, p. 237, 1991.

GOGOTOV, I.N.; MIROSHNIKOV, A.I. The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, p. 588-592, 2009.

GONG, G.; ZHENG, Z.; CHEN, H.; YUAN, C.; WANG, P.; YAO, L.; YU, Z. Enhanced Production of Surfactin by *Bacillus subtilis* E8 Mutant Obtained by Ion Beam Implantation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 27–31, 2009.

GUDIÑA, E.J.; FERNANDES, E.C.; RODRIGUES, A.I.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2015.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; COSTA, R.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 106-113, 2013^a.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; RODRIGUES, L.R.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 68, p. 56- 64, 2012.

GUDIÑA, E.J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L.R. Potentialther- apeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 667–675, 2013^b.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. **European Biophysics Journal**, v. 36, p. 305–314, 2007.

HOFFMANN, T.; FRANKENBERG, N.; MARINO, M.; JAHN, D. Ammonification in *Bacillus subtilis* Utilizing Dissimilatory Nitrite Reductase Is Dependent on *resDE*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 1, p. 186–189, 1998.

HÖRMANN, B.; MÜLLER, M.M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 674–680, 2010.

HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L. The positive effects of Mn^{2+} on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 381–389, 2015.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Lett Appl Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 176–179, 1995.

ISMAIL, W.; AL-ROWAIHI, I.S.; AL-HUMAM, A.A.; HAMZA, R.Y.; EL NAYAL, A.M.; BOUOUDINA, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 168–178, 2013.

IVANOVA, E.P.; VYSOTSKII, M.V.; SVETASHEV, V.I.; NEDASHKOVSKAYA, O.I.; GORSHKOVA, N.M.; MIKHAILOV, V.V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**, v. 2, p. 267–271, 1999.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A.J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603–4608, 2008.

KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total

structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 963-976, 1969.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, 311–318, 2012.

KIM, H.S.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249- 253, 2000.

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

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M. Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, na anionic lipopeptide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, p. 43-48, 1995.

KOCH V.; RUFFNER H.M.; SCHLUGERL K.; INNERTSBERGER E.; MENZEL H.; WEIS J. Effect of antifoam agents on the medium and microbial cells properties and process performance in small and large bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 435- 46, 1995.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and biotechnology. Surfactant science series.** (Eds.). Marcel Decker: New York, 1987, cap.11.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms

produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 204, p. 1-8, 1998.

KRONEMBERGER, F.A.; ANNA, L. M.M.S.; FERNANDES, A.C.L. B.; MENEZES, R.R. ; BORGES, C.P.; FREIRE, D.M.G. Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 33-45, 2008.

KUZMIN, P.; AKIMOV, S.; CHIZMADZHEV, Y.; ZIMMERBERG, J.; COHEN, F. Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt. **Biophysical Journal**, v. 88, p. 1120–1133, 2005.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G.E.; McINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 698-700, 1985.

LAZAR, I.; PETRISOR, I.G.; YEN, T.F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, p. 1353-1366, 2007.

LI, Q.; KANG, C.; WANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing oil field. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p.197- 199. 2002.

LIMA, A.S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

LIN, S.C.; Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, 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.

LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 31–37, 2015.

LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**, v. 14, p. 864-875, 2008.

MACHEL, H.; J. FOGHT. 2000. Products and depth limits of microbial activity in petroliferous subsurface settings. In: **Microbial Sediments**. Riding, R.E.; Awramik, S.M (eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 105-120.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 37-42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 48–52, 1998.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Applied Microbiology and Biotechnology Express**, v. 1, n. 5, 2011.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: Bennett, J.W.; Laskin, A.I.; Gadd, G.M. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**, vol. 52, 2003, pp. 101-121.

MANO, M.C.C. **Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2008. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

MARIN, C.P.; KASCHUK, J.J.; FROLLINI, E.; NITSCHKE, M. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 239–245, 2015.

McINERNEY, M.J.; JENNEMAN, G.E.; KNAPP, R.M.; MENZIE, D.E. ***In situ* microbial plugging process for subterranean formations**. US Patent no. 4558739, 1985.

MEDEIROS, S.I.G. **Síntese enzimática de biossurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Pós-Graduação de Ciências Exatas da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509 - 515, 2006.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-98, 2005.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), **Biosurfactants: production, properties, applications**. Marcel Decker, New York, 1993, pp. 392-371.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371, 2001.

NAKANO, M.M.; DAILLY, Y.P.; ZUBER, P.; CLARK, D.P. Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*:

Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6749-6755, 1997.

NAKANO, M.M.; HULETT, F.M. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p.1-7, 1997.

NETO, D.C.; MEIRA, J.A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P.P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 748- 755, 2009.

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

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

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of Biosurfactant: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 633-654, 2011.

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 coluna de bolhas e espuma**. 2010. 168p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

PRIEST, F.G. Systematics and ecology of *Bacillus* In: Sonenshein, A.L.; Hoch, J.A.; Losick, R. editors. ***Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria**. New York: American Society of Microbiology, 1993.

RAMOS, H.R.; HOFFMANN, T.; MARINO, M.; NEDJARI, H.; PRESECAN-SIEDEL, E.; REESEN, O.; GLASER, P.; JAHN, D. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 11, p. 3072-3080, 2000.

REIS, F.A.S.L.; SÉRVULO, E.F.C.; DE FRANÇA, F.P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, 2004.

ROCHA, M.V.P.; BARRETO, R.V.G.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Evaluation of cashew Apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 155, p. 63-75, 2009.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-239, 2001.

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, 2011.

SANTANA FILHO, A.P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: Estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, UFP, Curitiba.

SCHALLER, K.D.; FOX, S.L.; BRUHN, D.F.; NOAH, K.S.; BALA, G.A. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 827, v. 36, p. 113-116, 2004.

SCHILLING, O.; FRICK, O.; HERZBERG, C.; EHRENREICH, A.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; STULKE, J. Transcriptional and Metabolic Responses of *Bacillus subtilis* to the Availability of Organic Acids: Transcription Regulation Is Important but Not Sufficient To

Account for Metabolic Adaptation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 499–507, 2007.

SCHMIDELL W. Agitação e aeração em biorreatores. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biociologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001, pp. 277-329.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 358-363, 1997.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.

SEYDLOVÁ, G.; FIŠER, R.; ČABALA, R.; KOZLÍK, P.; SVOBODOVÁ, J.; PÁTEK, M. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 2370–2378, 2013.

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin - A review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food technology and biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 1330-9862, 2010.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.

SIGMA-ALDRICH. **Surfactin from *Bacillus subtilis***. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3523?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: jun. 2015.

SILVA, S.N.; SILVA, C.R.R. **Bioquímica**. Recife: EDUFRPE, 2010, 114 p.

SLIVINSKI, C.T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 2012. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica, UFP, Curitiba.

SONENSHEIN, A.L. **The Krebs citric acid cycle**. In: Sonenshein, A.L.; Hoch, J.A.; Losick, R. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. Washington: ASM, 2002.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of Fermentation Technology**. 2nd ed. Butterworth Heinemann, 2003, 359p.

StatSoft Inc. (2001). *Statistica* (version 7.0). Tulsa: StatSoft Inc.

SULLIVAN, E.S. Molecular genetics biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 263-269, 1998.

VAN DYKE, M.I.; COUTURE, P.; BRAUER, M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. *Pseudomonas aeruginosa* JG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 39, p. 1.071 -1.078, 1993.

VAZ, D.A.; GUDIÑA, E.J.; ALAMEDA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, J.R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167– 174, 2012.

VOGEL, A.I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. Quarta edição. Rio de Janeiro. Guanabara, 1981.

WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly-[gamma]-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3318- 3323, 2008.

WEI, Y. H.; CHU I.M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482, 2002.

WEI, Y.H.; WANG, L.F.; CHANG, J.F.; KUNG, S.S. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 174-178, 2003

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

WILLENBACHER, J.; ZWICK, M.; MOHR, T.; SCHMID, F.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of different *Bacillus* strains in respect of their ability to produce Surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9623–9632, 2014.

YAKIMOV, M.M.; AMRO, M.M.; BOCK, 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, p. 147- 160, 1997.

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, p. 1706-13, 1995

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, p. 1239-1247, 2007.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.R.; McINERNEY, M.J.; DUNCAN, K. E. *In-situ* lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus strains* correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 127–132, 2013.

YU, W.B.; GAO, S.H.; YIN C.Y.; ZHOU, Y.; YE, B.C. Comparative Transcriptome Analysis of *Bacillus subtilis* Responding to Dissolved Oxygen in Adenosine Fermentation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

ZAJIC, J.E.; STEFFENS, W. Biosurfactants. In: **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, n. 2, 1984, pp. 87-107.

ZHANG, G.; ROGERS, R.E.; FRENCH, W.T.; LAO, W. Investigation of microbial influences on seafloor gas-hydrate formations. **Marine Chemistry**, v. 103, p. 359-369, 2007.

ZHANG, X; XIANG, T. Review on Microbial Enhanced Oil Recovery Technology and Development in China. **International Journal of Petroleum Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 61-80, 2010.

APÊNDICE

Tabela 7.1 Resumo dos resultados obtidos da concentração máxima de biomassa (X_{max}), produtividade em células (P_c), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), produção máxima de surfactina (P_{max}), produtividade em surfactina (P_p), fator de conversão substrato a surfactina ($Y_{p/s}$) e fator de conversão de C-glicose em C-acetato ($Y_{C-ACET/C-GLIC}$), entre todos os cultivos realizados utilizando *B. subtilis* ATCC 21332.

Etapas	Ensaio/ condição	Relação C/N ($gC \cdot gN^{-1}$)	Tempo de cultivo (h)	X_{max} ($g \cdot L^{-1}$)	P_X ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})	P_{max} ($mg \cdot L^{-1}$)	P_c ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	$Y_{p/s}$ ($mg_{surf} \cdot g_{glc}^{-1}$)	$Y_{C-ACET/C-GLIC}$ ($g_{C-acet} \cdot g_{C-glic}^{-1}$)
1. Aeróbio x anaeróbio (meio MM)	Aeróbio (10 g glicose + 4,25 g NaNO ₃)	5,7	16	2,70	0,186	0,544	59,1	4,92	7,19	0,189
	Anaeróbio (10 g glicose + 4,25 g NaNO ₃)	5,7	22	1,22	0,074	0,251	29,5	1,84	4,67	0,440
2. Relação C/N (meio MM)	C/N 5,0 (10 g glicose + 4,85 g NaNO ₃)	5,0	24	1,45	0,075	0,290	35,0	1,75	4,22	0,363
	C/N 4,2 (10 g glicose + 5,82 g NaNO ₃)	4,2	28	1,50	0,053	0,178	42,1	1,91	4,71	0,312
3. Aumento proporcional das fontes de carbono e nitrogênio no meio MM (C/N 3,6)	C/N 3,6 (10 g glicose + 6,79 g NaNO ₃)	3,6	28	1,73	0,069	0,194	49,7	2,49	6,38	0,311
	A (15 g glicose + 10,2 g NaNO ₃)	3,6	49	1,42	0,048	0,158	85,2	1,74	5,68	0,220
4. Avaliação dos meios MM1 e MM2 (C/N 3,6)	B (20 g glicose + 13,6 g NaNO ₃)	3,6	53	1,10	0,027	0,099	85,9	1,75	8,13	0,246
	C - MM1 (20 g glicose + 13,6 g NaNO ₃)	3,6	66	1,63	0,027	0,148	83,2	1,83	5,69	0,196
5. Aumento proporcional das fontes de carbono e nitrogênio no meio MM2 (C/N 3,6)	D - MM2 (20 g glicose + 13,6 g NaNO ₃)	3,6	42	2,15	0,068	0,167	101,8	3,39	6,57	0,223
	E (30 g glicose + 20,3 g NaNO ₃)	3,6	42	2,25	0,051	0,171	114,5	3,18	4,55	0,218
	F (40 g glicose + 27,1 g NaNO ₃)	3,6	79	2,27	0,033	0,170	84,7	1,63	2,96	0,165