



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo da velocidade de agitação na produção de
Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator
mecanicamente agitado e aerado**

Bruno Willian Picão

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri
Coorientador: Prof. Dr. Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara - SP
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator mecanicamente agitado e aerado

Bruno Willian Picão

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em ciências Farmacêuticas,
área de concentração de em Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos
Biotecnológicos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri.
Coorientadora: Prof. Dr. Danielle Biscaro
Pedrolli.

Araraquara - SP

2021

-
- P586e** Picão, Bruno Willian.
Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator mecanicamente agitado e aerado / Bruno Willian Picão. – Araraquara: [S.n.], 2021.
64 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientador: Marcel Otavio Cerri.
Coorientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.
1. Riboflavina. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Biorreator. 4. Operação em Batelada.
I. Cerri, Marcel Otávio, orient. II. Pedrolli, Danielle Biscaro, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em Biorreator Mecanicamente Agitado e Aerado

AUTOR: BRUNO WILLIAN PICÃO

ORIENTADOR: MARCEL OTÁVIO CERRI

COORDINADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. MATEUS NORDI ESPERANÇA (Participação Virtual)
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 10 de junho de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais e familiares, por todo o suporte e apoio.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, por todos os ensinamentos e suporte para desenvolver esta pesquisa. Muito obrigado pela confiança, amizade e preocupação não só com o lado profissional mais pessoal também.

À minha coorientadora Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, pelos ensinamentos e suporte.

Aos meus pais e irmão, pela força, estímulo e participação em todos os momentos. Por todo o incentivo ao longo de toda minha vida, vocês são o meu maior motivo. Sem o apoio e suporte de vocês eu não teria conseguido. Amo vocês.

A toda minha família que sempre me motivou e esteve torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos Daniele, Renata, Agnes, Cassamo e Camila. Muito obrigado por todo apoio ao longo deste trabalho. Vocês foram uma peça fundamental para que eu conseguisse conciliar a vida profissional e pessoal. Agradeço em especial a Renata pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos com biorreator. Agradeço também ao Cassamo pelos conselhos e ajuda nos tratamentos de dados.

Agradeço aos colegas que somei durante este período no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP.

Aos técnicos Adriana, Ana, Flavio e Matheus pelo profissionalismo e pela disposição em ajudar.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara por todas as oportunidades, infraestrutura e suporte concedidos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo	IX
Abstract	X
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XIII
Nomenclatura	XIV
1. Introdução.	15
2. Revisão da literatura.	16
2.1. Biorreatores.	16
2.2. Biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR).....	18
2.3. Impelidores	19
2.4. Vitamina B2.....	20
2.5. Produção de vitamina B2 por <i>B. subtilis</i>	23
2.6. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos	25
3. Objetivo	28
4. Material e Métodos.....	28
4.1. Biorreator STR	28
4.2. Sistema de aquisição de dados e controle dos biorreatores.....	29
4.3. Cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> para produção de Riboflavina.	29
4.3.1. Microrganismo.	29
4.3.2. Preservação do microorganismo.	30
4.3.3. Meios de Cultura.....	30
4.3.4. Cultivo em Frascos <i>Erlenmeyers</i>	31
4.3.5. Cultivo em biorreator.	31
4.4. Métodos Analíticos.....	32
4.4.1. Determinação da Concentração Celular	32
4.4.2. Determinação de Riboflavina.....	33
4.4.3. Determinação da concentração de Açúcar.....	33
4.4.4. Determinação da concentração de CO ₂ e O ₂	34
4.4.5. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$). 34	
4.4.6. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$). 34	

4.4.7. Determinação da produção específica ($Y_{p/x}$), ($Y_{p/s}$) e produtividade (Pr).	35
4.5. Análise estatística	35
5. Resultados e discussão	36
5.1. Cultivo em Frascos de <i>Erlenmeyers</i>	36
5.2. Cultivo em frascos de <i>Erlenmeyer</i> com adição de Semi-helicoides.	38
5.3. Cultivo em STR.	40
5.4. Análise do efeito do ferro na degradação da Riboflavina.	47
5.5. Análise precipitação da Riboflavina em biorreator STR.	49
5.6. Parâmetros cinéticos	51
6. Conclusão.	53
7. Referências	55
Apêndice	60

Resumo

A Riboflavina (RF) também denominada como vitamina B₂, têm sido amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica, por ser um componente essencial do metabolismo básico, sendo um precursor de coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). A produção comercial de RF é baseada no cultivo microbiano, atualmente a biossíntese de RF tem sido bastante estudada na bactéria *Bacillus subtilis* devido a sua alta capacidade de secretar proteínas diretamente no meio de cultivo em curto período de tempo, tornando-se um modelo entre as cepas industriais produtoras de RF. Em bioprocessos aeróbicos o transporte de oxigênio é o mais importante processo de transferência de massa gás-líquido a ser considerado no projeto de bioprocessos, podendo afetar o crescimento celular e a formação do produto. Neste trabalho, os efeitos da velocidade de agitação sobre o desempenho da produção de RF por *Bacillus subtilis* foram investigados em um cultivo em modo batelada em um biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR). Os cultivos realizados durante o estudo apresentaram um perfil de redução na concentração de biomassa total juntamente com a diminuição da agitação, demonstrando uma relação direta entre a taxa de agitação operada com a expressão celular. Já a produtividade da RF não acompanhou a taxa de formação de biomassa de forma proporcional, indicando que o aumento na taxa de transferência de oxigênio gerada pelo aumento da agitação faz com que o microrganismo priorize o crescimento celular em detrimento da produção de RF. Indo de acordo com a literatura que relata que taxas de maior transferência de oxigênio o fluxo do consumo da fonte de carbono na rota metabólica é maior pela via Pentose Fosfato (PP), o que contribui para a alta taxa de crescimento, visto que ela oferece precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos essenciais para o crescimento celular, em contra partida, outra parte importante da rota metabólica na produção de RF é o metabolismo de Purinas que possui uma melhor eficiência em baixas taxas de transferência de oxigênio, sendo um ponto de equilíbrio na transferência de oxigênio de modo que não esteja em excesso nem escasso. Dentre as velocidades de agitação estudadas, o cultivo operado em 300 rpm foi mais o mais favorável para a biossíntese de RF, apesar de apresentar uma redução na velocidade de crescimento celular em comparação com os cultivos operados a 400 e 800 rpm. A concentração máxima de RF atingida foi de 2,151 g/L em 48 h com o rendimento $Y_{p/s}$ em média de 0,0242 g/g.

Palavras Chave: Riboflavina, *Bacillus subtilis*, Biorreator, Operação em Batelada.

Abstract

Riboflavin (RF), also called vitamin B₂, has been widely used in the food and pharmaceutical industries, as it is an essential component of basic metabolism, being a precursor to the coenzymes flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN). The commercial production of Riboflavin is based on microbial fermentation, currently a biosynthesis of Riboflavin has been extensively studied in the bacterium *Bacillus subtilis* due to its high capacity to secrete protein directly into the culture medium in a short period of time, becoming a model among industrial strains producing Riboflavin. In aerobic bioprocesses, oxygen transport is the most important gas-liquid mass transfer process to be considered in the bioprocess project, which can affect cell growth and product formation. In this work, the effects of agitation speed on the performance of Riboflavin production by *Bacillus subtilis* were investigated in batch model cultivation in a mechanically agitated and aerated Bioreactor (STR). The cultures performed during the study showed a profile of reduction in the concentration of total biomass together with the reduction of preparation, demonstrating a direct relationship between the rate of preparation operated with cell expression. RF productivity, on the other hand, did not follow the rate of biomass formation proportionally, indicating that the increase in oxygen transfer rate generated by increased production makes the microorganism prioritize cell growth over RF production. Going according to the literature that reports that higher oxygen transfer rates or flow of consumption of the carbon source in the metabolic route is higher through the Pentose Phosphate pathway (PP), which contributes to the high growth rate, since it offers precursors for a biosynthesis of nucleotides and amino acids essential for cell growth, on the other hand, another important part of the metabolic route in RF production is the Purine metabolism, which has a better efficiency at low oxygen transfer rates, being a balance point in the transfer of oxygen so that it is neither too much nor too little. Among the studied parameters, the cultivation operated at 300 rpm was the most favorable for a riboflavin biosynthesis, despite presenting a reduction in the speed of cell growth compared to the cultures operated at 400 and 800 rpm. The maximum concentration of riboflavin reached was 2,151 g/L in 48 h with a $Y_{p/s}$ yield on average of 0,0242 g/g.

Keywords: Riboflavin, *Bacillus subtilis*, Bioreactor, Batch Operation.

Lista de Figuras

Figura 1: Biorreator modelo STR, adaptado (LIU, Shijie, 2020).	18
Figura 2: Turbina tipo <i>Rushton</i> e seu padrão de fluxo (A), Turbina tipo Hélice marinha e seu padrão de fluxo (B); adaptado (LIU, Shijie, 2020).....	20
Figura 3: Estrutura química da Riboflavina, (SCHWECHHEIMER e colab., 2016). ..	21
Figura 4: Representação do metabolismo de Riboflavina em <i>B. subtilis</i> . Disponível em: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00740	24
Figura 5: Diagrama da transferência de oxigênio Gás-Líquido-Célula. Adaptado (CYTIVA, 2020).	26
Figura 6: Fases de crescimento celular padrão. Adaptado (CYTIVA, 2020)	27
Figura 7: Vista frontal de um biorreator STR; (A) impelidor do tipo turbina Smith; (B) impelidor do tipo turbina Rushton. (Autor).	29
Figura 8: Gráfico da curva de crescimento celular de cultivo realizado em Frasco de Erlenmeyer.	37
Figura 9: Gráfico das curvas de Crescimento celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar em cultivo realizado em Frasco de Erlenmeyer.....	37
Figura 10: Modelo dos semi-helicoides acoplados ao frasco de Erlenmeyer. (Autor).	38
Figura 11: Gráfico das curvas de crescimento celular dos cultivos realizado em Frascos de Erlenmeyer com e sem a adição de semi-helicoides.....	39
Figura 12: Gráfico das curvas de produção de Riboflavina dos cultivos realizado em Frascos de Erlenmeyer com e sem a adição de semi-helicoides.....	39
Figura 13: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 800 rpm, 4 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.	41
Figura 14: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 400 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.	42
Figura 15: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 200 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.	44
Figura 16: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 300 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.	45

Figura 17: Gráfico da comparação das curvas de Crescimento Celular e Produção de Riboflavina do cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 300 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.....	46
Figura 18: Gráfico de superfície 2D plotado através dos dados obtidos do DCC.....	48
Figura 19: Gráfico de Pareto do DCC para produção de Riboflavina ($\alpha=0,05$).	49
Figura 20: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em Biorreator STR em modo batelada a 400 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.	50
Figura 21: % de CO ₂ emitido no processo de cultivo em batelada operado a 400 rpm.	51
Figura 22: Curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L).....	60
Figura 23: Curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a unidade de fluorescência.	61
Figura 24: Curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a área sob a curva.	62
Figura 25: Curva de calibração da concentração de Sacarose (g/L) versus a área sob a curva.....	63
Figura 26: Curva de calibração da concentração de Glicose (g/L) versus a área sob a curva.	64
Figura 27: Curva de calibração da concentração de Frutose (g/L) versus a área sob a curva.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais exemplos de biorreatores, adaptado (SCHMIDELL e colab., 2001).	17
Tabela 2: Características das turbinas Rushton e Hélice marinha, adaptado (LIU, Shijie, 2020)	20
Tabela 3: Produção de Riboflavina por diferentes microrganismos e seus parâmetros de operação.	22
Tabela 4: Solubilidade do Oxigênio em água pura a 1 (atm), adaptado (NIELSEN e VILLADSEN, 2011).	26
Tabela 5: Dimensão do posicionamento das turbinas no biorreator STR.	29
Tabela 6: Cultivo em biorreator STR condições de operação.	32
Tabela 7: Matriz Delineamento de Composto Central (DCC) de duas variáveis.	36
Tabela 8: Variáveis analisadas no planejamento experimental DCC.	47
Tabela 9: Valores das variáveis do DCC e o resultado experimental obtido na produção de Riboflavina. Obs: © é o Ponto central.	47
Tabela 10: Concentrações máximas de biomassa, Riboflavina e parâmetros cinéticos dos reatores realizados nas rotações de 800 rpm, 400 rpm, 300 rpm e 200 rpm.	51
Tabela 11: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	60
Tabela 12: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	61
Tabela 13: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	62
Tabela 14: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	63
Tabela 15: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	63
Tabela 16: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da	64

Nomenclatura

Símbolo	Definição	Unidade
DCC	Delineamento de Composto Central	---
DO₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm	nm
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo	---
FMN	Flavina mononucleotídeo	---
H_A	Constante de Henry	atm.L.mol ⁻¹
H1	Altura entre a turbina <i>Smith</i> e <i>Rushton</i>	mm
H2	Altura entre a base do eixo e a turbina <i>Smith</i>	mm
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio	s ⁻¹
OTR	Taxa de transferência de oxigênio	mol.m ⁻³ .s ⁻¹
OUR	Taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo	mol.m ⁻³ .s ⁻¹
PP	Pentose Fosfato	---
Pr	Produtividade	g.L ⁻¹ .h ⁻¹
RF	Riboflavina	---
rpm	Rotação por minuto	r.min ⁻¹
STR	Biorreator mecanicamente agitado	---
Y_{p/x}	Produção específica de produto por células	g.g ⁻¹
Y_{p/s}	Produção específica de produto por substrato	g.g ⁻¹
Y_{x/s}	coeficiente de rendimento de células por substrato	g.g ⁻¹
μ_{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento celular	h ⁻¹

1. INTRODUÇÃO.

Um biorreator pode ser definido como um equipamento no qual ocorrem conversões bioquímicas mediadas por biocatalisadores biológicos como enzimas, células animais e vegetais ou microrganismos. Devido à alta diversidade e especificidade de cultivo e manutenção destes agentes, existem diversos tipos de biorreatores projetados de forma a fornecer o ambiente mais adequado para a ocorrência de tais reações, como condições ideais de pH, temperatura, fornecimento de nutrientes e homogeneização (MANDENIUS, 2016).

Em virtude de sua versatilidade para diversos tipos de bioprocessos, o biorreator convencional de tanque agitado (STR) é amplamente utilizado em escala laboratorial e industrial, devido a sua eficiente transferência de massa e energia.

O microrganismo *B. subtilis* é um dos mais utilizados industrialmente para a produção de Riboflavina (RF) (AVERIANOVA et al., 2020). Durante o processo de cultivo a aeração desempenha um papel crucial, o *B. subtilis* demanda cerca de 1,78 – 10,06 mol.kg⁻¹.h⁻¹ de oxigênio (MESTRE et al., 2019). Sendo assim, a suplementação contínua do oxigênio é necessária devido sua atuação no crescimento celular, participando de diversas vias metabólicas, operando nos processos de manutenção, transporte e divisão da célula. No entanto, sua solubilidade é baixa em soluções aquosas (7 – 8 mg/L entre 25 – 35 °C a 0,209 atm). Assim, a fim de avaliar se o bioprocessos está operando com condições adequadas é possível mensurar a taxa de transferência de oxigênio (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

A concentração de oxigênio dissolvido no meio, depende da transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, e da taxa de seu consumo pelo microrganismo. Tanto a transferência de massa de oxigênio do gás para a fase líquida quanto seu consumo pelo microrganismo têm importância decisiva, uma vez que em muitos processos a transferência de oxigênio é a etapa controladora do crescimento microbiano, podendo afetar a evolução dos bioprocessos (GARCIA-OCHOA et al., 2010).

A influência da velocidade de agitação desempenha um papel importante no suprimento de oxigênio em um processo de produção, como demonstra MAN et al., 2014 que analisaram a influência da agitação na produção de RF através de

cultivos com *B. subtilis*, onde agitações mais baixas foram benéficas para o crescimento celular e biossíntese de RF na fase inicial do processo de cultivo.

As condições de operação e as propriedades físicas das fases líquida e gasosa têm notável e complexa influência no desempenho do biorreator. É sempre desejado que o biorreator tenha a taxa máxima de transferência de massa, com mistura eficiente e entrada de energia mínima (LUO et al., 2013).

Neste contexto este trabalho teve o objetivo de avaliar o perfil cinético e os efeitos na produção de RF por *B. subtilis* com relação a velocidade de agitação, fator que possui um grande impacto na transferência de oxigênio e taxa de cisalhamento, sendo estes, parâmetros essenciais para controle e manutenção dos cultivos.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. Biorreatores.

Biorreatores são reatores químicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, como enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais). Desde a década de 1940, tem sido utilizado biorreatores a base de microrganismos para a produção industrial de diversos produtos como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes usados para tratar resíduos orgânicos industriais ou domésticos. Nos últimos anos o emprego de biorreatores com células animais tem se desenvolvido bastante para a produção de produtos ligados à saúde humana e animal, tais como vacinas virais, anticorpos monoclonais e hormônios (LIU, 2020; PAWAR, 2016; SCHMIDELL et al., 2001).

As funções de um biorreator incluem, contenção (segurança e esterilidade), introdução de reagentes gasosos (por exemplo, oxigênio), introdução de reagentes líquidos (por exemplo, fonte de carbono), remoção de produtos gasosos (por exemplo, dióxido de carbono), controle do ambiente físico (por exemplo, temperatura, taxa de cisalhamento, pH), suspensão (por exemplo, células, material particulado) e dispersão (sistemas de duas fases). Atualmente existem diversos tipos de biorreatores com características bastante distintas no que se refere aos fenômenos de transporte (calor, massa e quantidade de movimento) (LIU, 2020). Tais modelos, possuem diferentes *design* de acordo com o modo de

operação dos bioprocessos industriais, são classificados de acordo com o tipo de biocatalisador utilizado (microrganismos, células ou enzimas) e modo de operação. A Tabela 1 apresenta os principais modelos de biorreatores.

Tabela 1: Principais exemplos de biorreatores, adaptado (SCHMIDELL et al., 2001).

Reatores em fase aquosa
• STR: "stirred tank reactor". • Coluna de bolhas ("bubble column"). • Reatores "Air-lift". • Reatores de fluxo pistonado ("plug-flow"). • Reatores com leito fixo. • Reatores com leito fluidizado. • Outras concepções. • Reatores com membranas planas. • Reatores de fibra oca ("hollow-fiber").
Reatores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)
• Reatores estáticos (reatores com bandejas). • Reatores com agitação (tambor rotativo). • Reatores com leito fixo. • Reatores com leito fluidizado gás-sólido.

Dentre essa grande variedade de modelos de biorreatores, alguns dos tipos mais comuns são os reatores mecanicamente agitados (STR), colunas de bolhas e *Airlift*. O modelo com maior destaque é o STR que consistem em cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente (ESPERANÇA, 2014).

Os modelos STR possuem um importante destaque no ramo da biotecnologia, devido a sua alta capacidade na transferência de massa, fator esse, de extrema importância em reações trifásicas (gás-líquido-sólido) devido à complexa mecânica dos fluidos juntamente com a natureza complexa das células (LIU, 2020; ZHANG et al., 2017).

2.2. Biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR).

O biorreator do tipo STR consiste em um tanque cilíndrico no qual são comuns relações entre a altura e o diâmetro de 2:1 ou 3:1. Sua mistura e a dispersão de bolhas são obtidas por agitação mecânica realizada por impelidores acoplados ao eixo central ao biorreator, o qual, demanda um alto gasto de energia por unidade de volume. A entrada de gás é realizada por meio de aspersores que ficam na parte inferior, o tanque agitado pode apresentar defletores internos, cuja função é evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido (DORAN, 2013). A Figura 1 apresenta o modelo de biorreator STR.

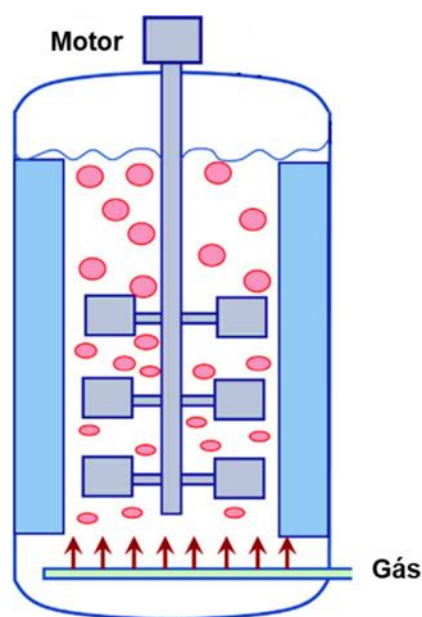


Figura 1: Biorreator modelo STR, adaptado (LIU, 2020).

Em biorreatores a homogeneidade é um parâmetro de extrema importância, em modelos do tipo STR esse processo é controlado principalmente pelo tipo de impelidor empregado no sistema. A dispersão do gás é realizada principalmente pelo Impelidor (transferência de oxigênio para a cultura), que deve fornecer agitação suficiente para dispersar as bolhas de gás por todo o vaso e aumentar seu tempo de residência (LIU, 2020).

O desejo de rapidez na dispersão do gás deve, no entanto, ser equilibrada com o impacto na cultura. Impelidores de alto cisalhamento são geralmente utilizados em sistemas microbianos, onde o crescimento requer altas taxas de transferência de massa. Para células animais e vegetais, um ambiente de alto cisalhamento pode ser prejudicial por serem muito sensíveis ao cisalhamento (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; RIBEIRO, 2017).

Existem diversos tipos de impelidores disponíveis, tais alternativas juntamente com a facilidade no aumento de escala, boa mistura e alta taxa na transferência de massa é o que torna o biorreator do tipo STR o modelo mais utilizado industrialmente (STUANI, 2015). Dentre os principais modelos de impelidores usados para o este tipo de reator, a turbina de 6 pás planas com disco também conhecida como turbina "Rushton" é a mais amplamente empregada em processos fermentativos devido a sua alta eficiência na dispersão de gás (LIU, 2020; SCHMIDELL et al., 2001).

2.3. Impelidores

Agitação e mistura são operações unitárias essenciais na maioria dos processos industriais e têm por objetivo a obtenção de matérias primas ou produtos uniformes. Quando um sistema de agitação e mistura não está corretamente projetado e controlado obtém-se misturas indesejáveis, o que pode acarretar em perdas de produto e aumento no custo do processo (COSTA JÚNIOR; CORREA, 2019).

Os impelidores mecânicos podem ser classificados de acordo com a direção do movimento do fluido no interior do tanque propulsionado pela rotação do mesmo. São divididos basicamente em axial e radial (LOPES, 2013).

Os modelos de fluxo radial são aqueles que geram linhas de fluxo perpendicularmente ao eixo do agitador, ou seja, impulsiona a grande massa líquida contra as paredes do tanque, possuem alto consumo de potência, grande capacidade dispersiva, são aplicados na dispersão de gases, transferência de massa e dissolução de materiais sólidos, são encontrados nos modelos de turbina de pás retas, turbina de pás inclinadas e turbina de disco. Já os modelos de fluxo Axial são aqueles que geram linhas de fluxo paralelas ao eixo do agitador, ou seja, impulsiona a grande massa líquida contra o fundo do tanque, seu consumo de potência é baixo, possuem grande abrangência por sua distribuição geométrica do fluxo dentro do tanque e sua agressividade é baixa ao produto. São aplicados na mistura de produtos líquidos, sólidos em suspensão e transferência de calor. São encontrados nos modelos de hélice naval, turbinas de pás inclinadas e turbina de alto rendimento (SABIONI, 2013).

A Figura 2 abaixo demonstra o esquema de dois impelidores e seus impactos sobre os padrões de fluxo dentro do reator. A Tabela 2 apresenta as características das turbinas.

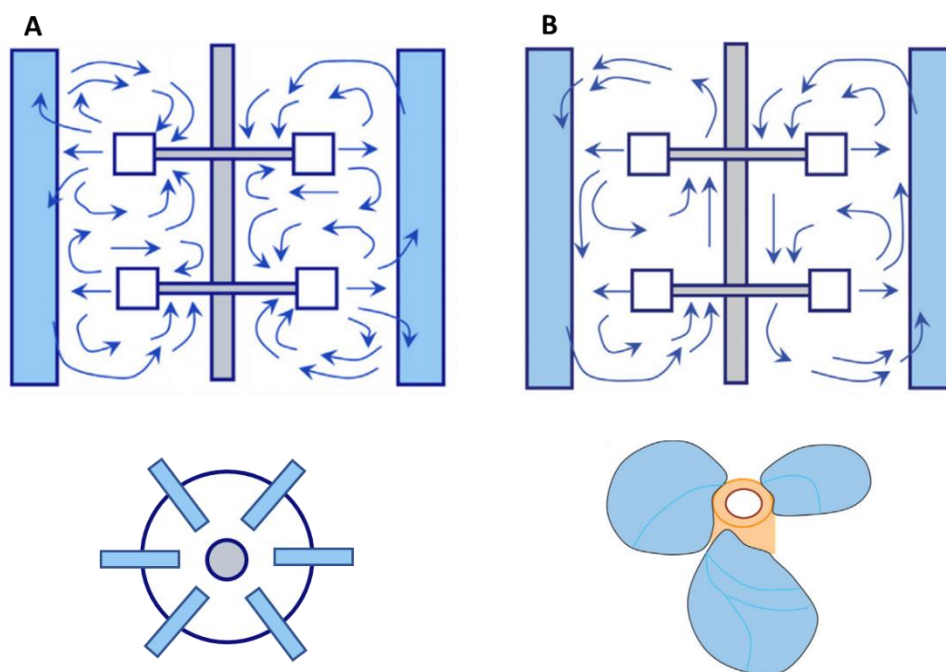


Figura 2: Turbina tipo *Rushton* e seu padrão de fluxo (A), Turbina tipo Hélice marinha e seu padrão de fluxo (B); adaptado (LIU, 2020).

Tabela 2: Características das turbinas *Rushton* e Hélice marinha, adaptado (LIU, 2020)

Características	<i>Rushton</i>	Hélice marinha
Tipo de fluxo	Radial	Axial
Transferência de gasosa	Alta	Baixa
Dispersão	Alta	Baixa
Suspensão	Baixa	Alta
Mistura	Média	Alta

2.4. Vitamina B2.

A RF conhecida como vitamina B2, também denominada Lactoflavina ou vitamina G, é um sólido microcristalino de cor amarelo/alaranjada, amargo e inodoro. A RF possui estabilidade em meio ácido, já em meio alcalino decompõe-se rapidamente o mesmo também ocorre na presença de luz. Com relação a temperatura ela se decompõe entre 278 - 282°C. A análise da absorbância de soluções aquosas de RF pode ser realizada em leituras de 223, 266, 373 e 445 nm.

Embora a RF seja higroscópica é pouco solúvel em água e etanol, sua solubilidade é de 100 - 130 mg/L e 45 mg/L à temperatura ambiente em água e etanol. É pouco solúvel em álcoois alílicos e benzílicos, acetato de amila e fenol e praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e acetona (O'NEIL, 2006; SILVA et al., 2005). A Figura 3 apresenta a estrutura química da RF.

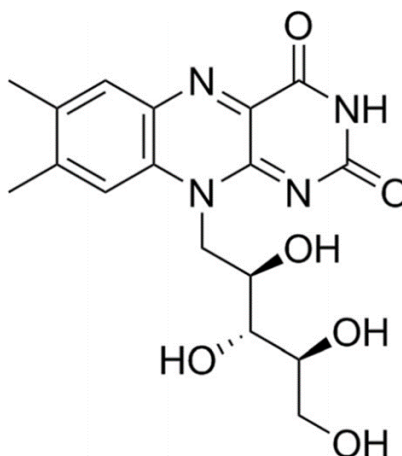


Figura 3: Estrutura química da *Riboflavina*, (SCHWECHHEIMER et al., 2016).

A RF pode ser sintetizada por plantas e microrganismos, já para humanos e animais é um componente obrigatório na dieta, por não haver uma via biossintética endógena. Desempenha um papel importante para múltiplas funções celulares, uma vez que serve como um precursor das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que estão envolvidas no metabolismo oxidativo entre outros processos (ABBAS; SIBIRNY, 2011).

A ingestão diária recomendada de RF é de 1,3 mg/dia para homens e 1,1 mg / dia para mulheres, sendo realizada principalmente através do consumo de carnes e produtos de laticínio. A sua deficiência pode contribuir para diversos problemas de saúde como aumento do risco de doença cardiovascular, prejuízo no metabolismo do ferro e cegueira noturna (ABBAS; SIBIRNY, 2011).

Nas últimas décadas, o interesse crescente transformou a RF em um dos produtos mais importantes da biotecnologia. A RF, que é sintetizada exclusivamente por rota biotecnológica através de microrganismos, é usada principalmente como aditivo alimentar (cerca de 70% do mercado atual), enquanto cerca de 30% são usados para aplicações farmacêuticas (SCHWECHHEIMER et al., 2016). A Tabela 3 apresenta a produção de RF por diferentes microrganismos.

Tabela 3: Produção de Riboflavina por diferentes microrganismos e seus parâmetros de operação.

Microrganismo	Condições de operação	Rendimento	Referência
<i>B. subtilis</i> modificado	Quimiostato / Batelada alimentada / 600 a 1500 rpm / 1,5 vvm / pH 6,6 / 37°C / 45h	0,08 g/L	(SAUER et al., 1996)
	Biorreator STR / Batelada / 700 rpm / 0,5 vvm / pH 7,5 / 34°C / 72h	1,05 g/L	(USUI; YAMAMOTO; NAKAMATU, 1997)
	Biorreator STR / Batelada alimentada / 1100 rpm / 0,6 vvm / pH 6,5 – 7,2 / 37°C / 42h	12,4 g/L	(DEBABOV et al., 1997)
	Biorreator STR / Batelada alimentada / 1000 rpm / 1 a 1,5 vvm / pH 6,8 / 39°C / 56h	4 – 15 g/L	(PERKINS et al., 1999)
	Biorreator STR / Batelada alimentada / 800 rpm / 1 vvm / pH 7,2 – 7,4 / 37°C / 90h	26,8 g/L	(LEE et al., 2004a)
	Biorreator STR / Batelada alimentada / 850 rpm / 1,1 vvm / pH 7,2 / 41°C / 48h	16,36 g/L	(WU et al., 2007)
	Biorreator STR / Batelada alimentada / 600 - 900 rpm / 1,3 vvm / pH 6,9 / 40°C / 48h	9,4 g/L	(MAN et al., 2014)
<i>B. subtilis</i> selvagem	Shaker de agitação / 200 rpm / pH 6,5 / 30°C / 72h	0,274 g/L	(HEMIDA ABD-ALLA et al., 2016)
	Shaker de agitação / 200 rpm / pH - / 30°C / 72h	0,0117 g/L	(ORAEI; RAZAVI; KHODAIYAN, 2018)
<i>A. gossypii</i> selvagem	Biorreator STR / Batelada / 600 rpm / 1 vvm / pH 6,8 / 28°C / 192h	5,2 g/L	(SUGIMOTO et al., 2010)
<i>A. gossypii</i> modificado	Biorreator STR / Batelada / 600 rpm / 1 vvm / pH 6,8 / 28°C / 216h	13,7 g/L	(PARK et al., 2011)
<i>C. famata</i> modificado	Biorreator STR / Batelada alimentada / 1200 rpm / 1,2 vvm / pH 5,5 / 28°C / 126h	16,4 g/L	(DMYTRUK et al., 2014)

2.5. Produção de vitamina B2 por *B. subtilis*.

B. subtilis é uma bactéria Gram-positiva e possui uma forma de bastonete, que produz endósporos que permitem a sobrevivência em condições ambientais extremas, incluindo calor e dessecação (HÄRTIG; JAHN, 2012). Foi originalmente denominada *Vibrio subtilis* em 1835 por Christian Gottfried Ehrenberg, e em 1872 foi renomeada *B. subtilis* por Ferdinand Cohn (KOVÁCS, 2019). Este microrganismo é uma das bactérias mais bem caracterizadas entre os Gram-positivos e é considerada um sistema modelo para diferenciação e desenvolvimento celular (AIZAWA, 2014).

B. subtilis tornou-se a espécie mais estudada do gênero *Bacillus* devido à sua competência natural para a captação de DNA extracelular que facilita a modificação genética simples e a ocorrência de esporulação. Os esporos dormentes podem sobreviver a circunstâncias severas (alta temperatura, dessecação, UV e radiação γ), predação por microrganismos e macroorganismos, ou mesmo condições extraterrestres. *B. subtilis* pode ser isolado de vários ambientes, do solo aos habitats marinhos, e utilizado em várias aplicações, desde a produção de enzimas e fermentação de alimentos até o biocontrole de plantas (KOVÁCS, 2019).

Em comparação com outros microrganismos, as espécies de *Bacillus* gram-positivas são bem conhecidas por sua capacidade superior de secreção de proteínas. Além disso, seu bom crescimento em fontes de carbono baratas, metabolismo endógeno distinto e robustez em fermentações industriais tornaram as espécies de *Bacillus* os organismos preferidos para a produção industrial de uma variedade de produtos (GU et al., 2018).

B. subtilis vem sendo amplamente empregada na indústria biotecnológica. Uma dessas aplicações é a produção de RF sendo atualmente um dos mecanismos de produção de RF mais competitivo do mercado (AVERIANOVA et al., 2020; SHI et al., 2009). A Figura 4 apresenta a rota metabólica de produção da RF e seus derivados Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN).

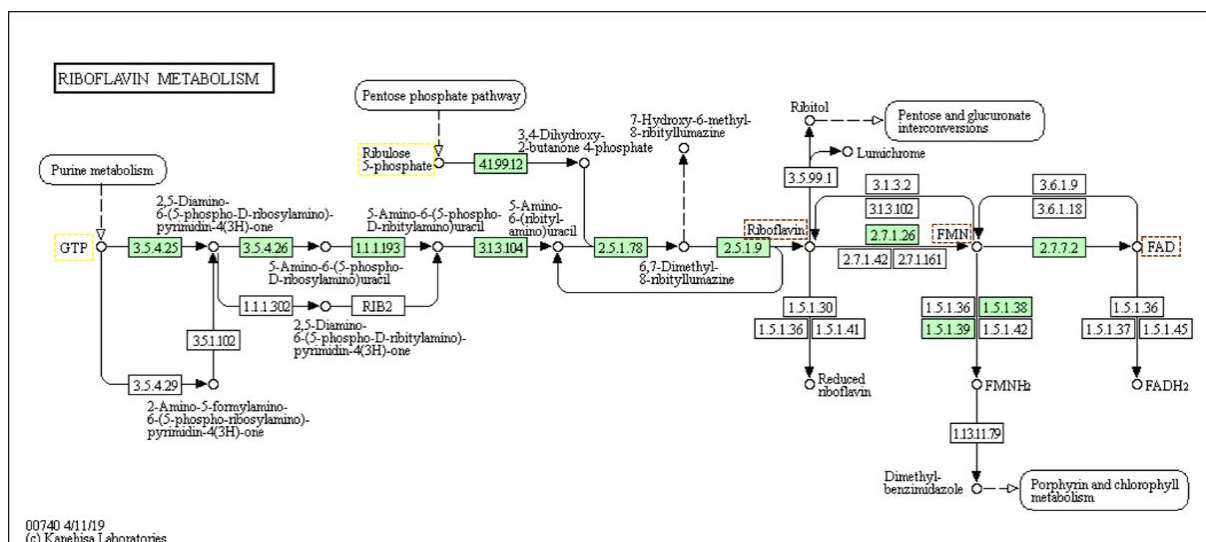


Figura 4: Representação do metabolismo de Riboflavina em *B. subtilis*. Disponível em: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00740.

O *B. subtilis* utiliza como substrato carboidratos como fonte de carbono, a biossíntese de RF começa a partir dos precursores GTP e Ru5P e a RF pode ser ainda convertida em FMN e FAD. As vias biossintéticas que levam do substrato à síntese de flavinas abrangem β -oxidação, o ciclo glicérato, o ciclo TCA, a gliconeogênese, a via PP (ramo oxidativo), a via purina e a via de síntese de flavina (LIU et al., 2020). A engenharia biotecnológica das cepas de superprodução de flavina é sempre realizada pela superexpressão de genes nas vias relevantes, supressão de caminhos concorrentes e interrupção de genes regulatórios responsáveis pela inibição enzimática. Em *B. subtilis*, a via biossintética de RF é basicamente controlada pelo operon *rib* que consiste em cinco genes - *ribDG*, *ribE*, *ribAB*, *ribH*, *ribT*. A superexpressão dos genes responsáveis pela síntese de RF é um dos métodos mais comuns para melhorar a síntese de RF em *B. subtilis* (PEDROLI et al., 2015b).

Tradicionalmente, a produção de RF era realizada por processos químicos, mas nos últimos anos os processos biotecnológicos têm se tornando mais populares utilizando diversos tipos de microrganismos como o *B. subtilis* (SILVA et al., 2005). Esse desenvolvimento foi em grande parte impulsionado pela tecnologia de DNA recombinante, conhecido como engenharia metabólica. Uma vez que as vias metabólicas centrais e biossintéticas específicas são otimizadas para um determinado produto, onde as características gerais do hospedeiro de produção se tornam governáveis assim como o desempenho do processo comercial (ZAMBONI

et al., 2003). De acordo com a antiga classificação de Demain, microrganismos capazes de acumular mais de 10 mg/L de RF foram reconhecidos como superprodutores sendo dividido posteriormente divididos em três grupos: fracos (Produzindo aproximadamente 10 mg/L), moderados (Produção maior que 600 mg/L), e forte (Produção maior que 10 g/L) (AVERIANOVA et al., 2020).

A superprodução de RF alcançada pela obtenção de cepas geneticamente modificadas com superexpressão de certos genes e resistência a análogos de purina e RF é descrita em diversos trabalhos na literatura. Como descrito por SHI e colab., 2009, que obtiveram um aumento de 25% (15 g/L em modo Batelada-Alimentada) na produção de RF comparada a linhagem selvagem (*B. subtilis* 168) do centro de estoque genético de *Bacillus*.

O mercado anual total de RF é de aproximadamente 9.000 toneladas de RF, que tem sido bastante usada no enriquecimento nutricional de alimentos e rações animais (AVERIANOVA et al., 2020).

2.6. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos

Entre os processos biotecnológicos de interesse industrial, envolvendo o cultivo de células microbianas, sem dúvida os processos conduzidos em aerobiose encontram uma situação de enorme destaque (LIU, 2020). Assim, por exemplo, a produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, fermentos e inoculantes, proteínas recombinantes (hormônios de crescimento, insulina; etc.), constitui em sua grande maioria processos aeróbios. Igualmente, o cultivo de células animais, visando a produção de produtos ou a posterior infecção por vírus para a obtenção de vacinas, são processos aeróbios (SCHMIDELL et al., 2001).

Em bioprocessos aeróbicos o transporte de oxigênio é o mais importante processo de transferência de massa gás-líquido a ser considerado no projeto de bioprocessos. O oxigênio é um substrato chave, devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso, isto é, a "capacidade de armazenamento" de oxigênio na água é baixa (7 – 8 mg/L entre 25 – 35 °C a 0,209 atm) sendo essencial manter uma transferência de oxigênio contínua da fase gasosa para a fase líquida, afim de manter a viabilidade do metabolismo celular (BADINO; MENDES; CERRI, 2016; SCHMIDELL et al., 2001). Na Tabela 4 encontram-se dados a respeito da solubilidade do oxigênio para diferentes temperaturas.

Tabela 4: Solubilidade do Oxigênio em água pura a 1 (atm), adaptado (NIELSEN; VILLADSEN, 2011).

Temperatura (°C)	Solubilidade do O ₂ (mmol L ⁻¹)
0	2,18
10	1,70
15	1,54
20	1,38
25	1,36
30	1,16
40	1,03

Desta forma, processos fermentativos aeróbicos exigem um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, sendo este um substrato chave para o crescimento, produção, e atividades de manutenção. A concentração de o oxigênio dissolvido no caldo, depende da taxa de transferência de oxigênio (OTR) da fase gasosa para a fase líquida, e da taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo (OUR) (GARCIA-OCHOA et al., 2010). A Figura 5 demonstra o processo de transferência de oxigênio da bolha de gás até a célula, e as respectivas resistências do processo.

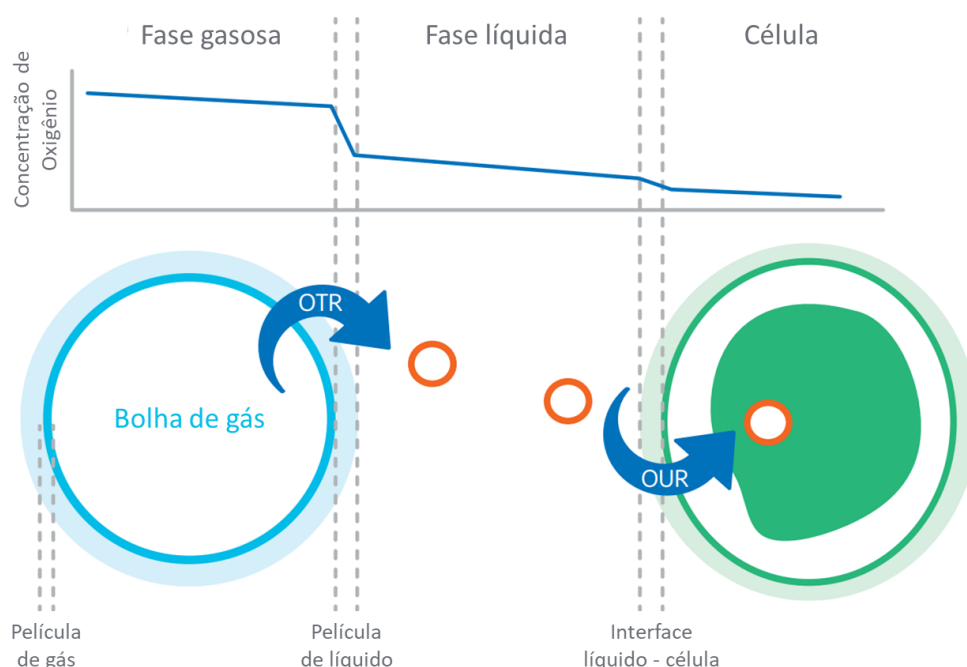


Figura 5: Diagrama da transferência de oxigênio Gás-Líquido-Célula. Adaptado (CYTIVA, 2020).

De modo simples o transporte de oxigênio de uma fase gasosa em meio líquido para o interior de uma célula ocorre em nas seguintes etapas:

1. Difusão do O_2 da bolha de gás para interface Gás-Líquido.
2. Transporte através da interface Gás-Líquido.
3. Difusão do O_2 através de uma região de líquido relativamente estagnada adjacente a bolha de gás, ou seja, da interface Gás-Líquido para o Líquido.
4. Transporte do O_2 dissolvido para a célula.
5. Difusão do O_2 através da película de líquido estagnado ao redor da célula.
6. Transporte através da membrana celular.
7. Transporte de O_2 dissolvido dentro da célula para o local de reação intracelular.

Durante um processo fermentativo, OUR é inicialmente baixo já que há pouco ganho de densidade celular. Conforme a densidade celular aumenta no decorrer do processo o OUR aumenta até que o OTR se torne uma taxa limitante. Isso ocorre pois o OTR é a etapa que apresenta maior resistência na transferência de oxigênio (CYTIVA, 2020). A Figura 6 ilustra a demanda de oxigênio no decorrer das fases do crescimento microbiano padrão.



Figura 6: Fases de crescimento celular padrão. Adaptado (CYTIVA, 2020)

As taxas OTR e OUR são correlacionadas pelo coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio (k_La), cujo valor é uma função de parâmetros

incluindo as propriedades físicas do fluido (densidade, tensão superficial e comportamento reológico), morfologia e concentração celular, modelo e geometria do biorreator e condições de operação (velocidade de agitação e / ou taxa de fluxo de ar). Consequentemente, a consideração de k_{La} é essencial no projeto e caracterização de biorreatores usados em bioprocessos, uma vez que é o parâmetro-chave usado para garantir a transferência de oxigênio adequada (MESTRE et al., 2019).

De modo geral a literatura aborda a produção de RF por microrganismos voltada mais para os aspectos metabólicos, ou seja, focados na modificação através da engenharia genética havendo poucos trabalhos focados nos parâmetros operacionais. Como no caso da velocidade de agitação que possui influencia em 2 parâmetros extremamente importantes em cultivos, sendo a transferência de oxigênio e taxa de cisalhamento.

3. OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo estudar os efeitos da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *B. subtilis* em um biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Biorreator STR

Foi utilizado o biorreator comercial de tanque agitado da Tecnal, TEC-BIO-7,5VI (Piracicaba - SP, Brasil). Equipado com controlador de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação, rotâmetro para aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de 7,5 L, e volume útil de 5,0 L. O diâmetro interno do biorreator é 0,190 m e diâmetro externo 0,217 m. O sistema dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com largura de 0,015 m e foi montado utilizando-se dois impelidores uma do tipo turbina *Rushton* e outra do tipo *Smith* apresentado na Figura 7.

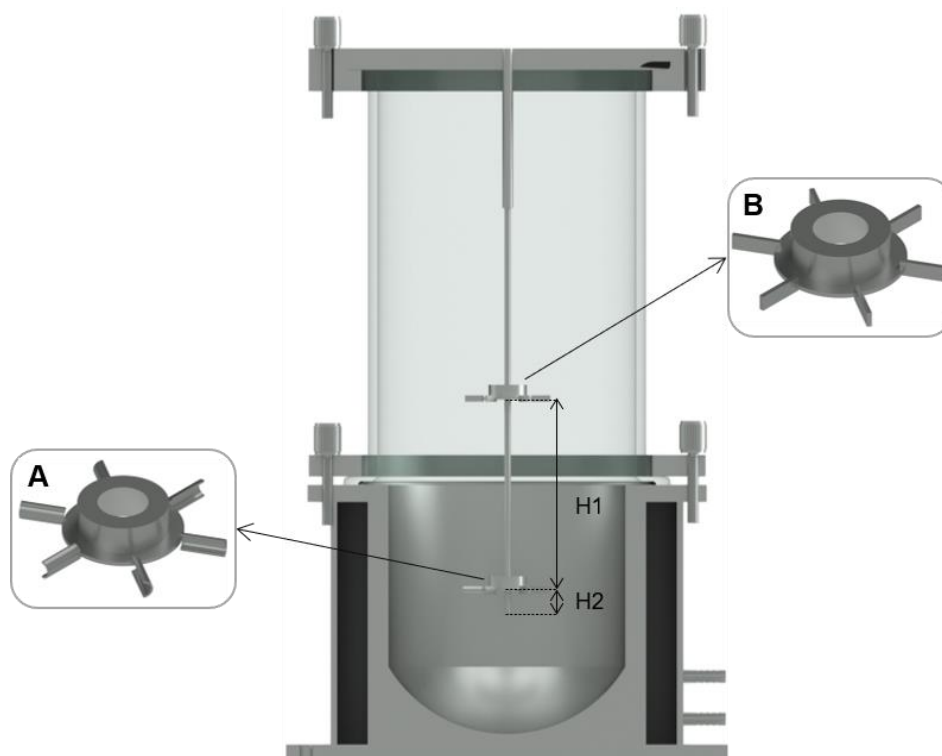


Figura 7: Vista frontal de um biorreator STR; (A) impelidor do tipo turbina Smith; (B) impelidor do tipo turbina Rushton. (Autor).

Tabela 5: Dimensão do posicionamento das turbinas no biorreator STR.

Dimensões (mm)	
H1	100
H2	10

4.2. Sistema de aquisição de dados e controle dos biorreatores.

Os estudos foram realizados utilizando um Controlador Tecnal, TEC-BIO-FLEX (Piracicaba - SP, Brasil) com sensor de temperatura Pt-100, medidor de fluxo de gás Aalborg - GFC37, 4 bombas peristálticas (nutrientes, antiespumante, ácido e base), sistema de agitação e conexão para sensores de oxigênio e pH. Sendo o sensor de oxigênio dissolvido Mettler Toledo, O2 Transmitter 4500 (Barueri – SP, Brasil) e o sensor de pH Mettler Toledo, 405-DPAS-SCK8S/225 (Barueri – SP, Brasil). juntamente com um sistema de aquisição de dados para permitir medições em tempo real.

4.3. Cultivos de *Bacillus subtilis* para produção de Riboflavina.

4.3.1. Microrganismo.

Foi utilizado o *B. subtilis* superprodutor de RF. A linhagem possui duas mutações causadas pela seleção com a antivitaminas roseoflavina. Uma mutação pontual no gene *ribC* leva à produção de uma flavokinase com atividade reduzida a

1% em comparação ao tipo selvagem, provocando uma drástica redução na reação de fosforilação da RF (MACK; VAN LOON; HOHMANN, 1998). Nesta linhagem, o *operon* contendo os genes da via biossintética da RF teve seu promotor natural trocado pelo promotor *veg*, um promotor constitutivo e forte em *B. subtilis*. A última alteração feita nessa linhagem foi a mutação do gene *tkl*. O gene mutante codifica uma transketolase menos ativa, gerando um acúmulo de ribulose 5'-fosfato, um dos precursores da biossíntese de RF (GARCÍA-ANGULO, 2017). Foi realizado o desenvolvimento de um sRNA que se liga a um Riboswitch denominado *ribDG*. Esse Riboswitch regula a expressão de RF através da detecção da concentração de FMN, fazendo com que a produção de RF cesse quando detectado uma alta concentração de FMN. Porém com a ligação desse sRNA o Riboswitch é desativado, produzindo RF independente da concentração de FMN. Esse *B. subtilis* foi fornecido pela colaboradora Dr. Danielle Biscaro Pedrolli que é Professora Assistente Doutora em RDIDP no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara.

4.3.2. Preservação do microorganismo.

Foi preparado um pré-inóculo da cepa de *B. subtilis* superprodutor de RF em meio líquido (20 g.L⁻¹ LB; 20 g.L⁻¹ Sacarose), realizado a 220 rpm e 37°C em overnight. Deste, foi retirada uma alíquota de 720µL que foi adicionada assepticamente a um criotubo estéril. Como crioprotetor foram adicionados 480µL de glicerol 50% (v/v) obtendo-se volume final de 1200 µL. Em seguida os criotubos foram estocados a -80°C.

4.3.3. Meios de Cultura.

4.3.3.1. Meio de Cultura de reativação (MR).

O meio de cultura de reativação era composto por Meio LB 20,0 g.L⁻¹ e Sacarose 20,0 g.L⁻¹.

4.3.3.2. Meio de Cultura de Inóculo (MI).

O meio de cultura utilizado é composto por 70 g.L⁻¹ de Sacarose, 1 g.L⁻¹ de Extrato de levedura, 25 g.L⁻¹ de Nitrato de sódio (NaNO₃), 0,333 g.L⁻¹ de Fosfato monopotássico (KH₂PO₄), 1 g.L⁻¹ de Fosfato dissódico dodecahidratado (Na₂HPO₄.12H₂O), 0,15 g.L⁻¹ de Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O),

7,5 mg.L⁻¹ de Cloreto de cálcio (CaCl₂), 6 mg.L⁻¹ de Sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) e 6 mg.L⁻¹ de Sulfato de ferroso (FeSO₄.7H₂O). O meio de cultivo teve o pH ajustado para 7,0 antes da esterilização (WANG et al., 2018).

4.3.3.3. Meio de Cultura de Produção (MP).

O meio de produção teve a mesma composição do meio de cultura do inóculo, porém com 10% a mais de concentração na composição. O meio de cultivo teve pH do meio foi corrigido para 7,0 em reator, após o processo de esterilização.

4.3.4. Cultivo em Frascos *Erlenmeyers*

4.3.4.1. Reativação

No processo de reativação foram inoculados 2 Falcons (50 mL) contendo 10 mL de MR, sendo inoculados a partir da cepa congelada de *B. subtilis* superprodutor através de raspagem. Os Falcons foram mantidos em 220 rpm a 37°C por 24h.

4.3.4.2. Inóculo

Nesta etapa eram adicionado os 10 mL de meio contidos nos 2 Falcons após o processo de reativação em 2 frascos de *Erlenmeyers* (500 mL) contendo 90 mL cada de MR. Os frascos de *Erlenmeyers* foram mantidos em 220 rpm a 37°C por 24h.

4.3.4.3. Produção

Ao final do processo de Inóculo o meio contido nos 2 frascos de *Erlenmeyers* eram reunidos e um volume de 10 mL era transferido para os frascos de *Erlenmeyers* de produção contendo 90 mL cada de MI.

4.3.4.4. Condições de Cultivo.

Os cultivos foram realizados em Shaker de agitação a 220 rpm e 37°C.

4.3.5. Cultivo em biorreator.

4.3.5.1. Reativação.

Mesmo procedimento descrito no item 4.3.4.1.

4.3.5.2. Pré-Inóculo.

Mesmo procedimento descrito no item 4.3.4.2.

4.3.5.3. Inóculo.

Na etapa de inóculo era realizado a mistura dos meios contidos nos 2 *Erlenmeyers* após o processo de Pré-Inóculo, onde era transferido dessa mistura 10 mL para 6 *Erlenmeyers* (500 mL) contendo 90 mL cada de MI. Os frascos de *Erlenmeyers* eram mantidos em 220 rpm a 37°C por 24h.

4.3.5.4. Produção.

Ao final do processo de Inóculo o meio contido nos 6 *Erlenmeyers* eram reunidos e um volume correspondente a 10% do volume de operação do cultivo era transferido para o reator contendo MP. Conforme necessidade correções no Inóculo eram realizadas, para que a DO₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) inicial do processo de cultivo fosse de $1,0 \pm 0,5$ UA (unidade de absorbância).

4.3.5.5. Condições de Cultivo em biorreator STR.

Em termos de modo de operação a cultivo foi operada em modo batelada, os parametros de operação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Cultivo em biorreator STR condições de operação.				
Agitação (rpm)	Vazão (vvm)	Temperatura (°C)	pH	Volume (L)
800	0,5	37	7	4
400				5
300				5
200				5

4.4. Métodos Analíticos.

4.4.1. Determinação da Concentração Celular

O crescimento celular foi acompanhado de acordo com a densidade óptica do meio de cultura no comprimento de onda de 600nm (DO_{600nm}) utilizando espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC®, GENESYS 10S (Waltham - MA, EUA) bem como por medidas de massa seca (g.L⁻¹). A curva de calibração para conversão dos valores de DO_{600nm} em massa de célula (g.L⁻¹) foi obtida a partir dos cultivos

realizados em shaker, através da adição de um volume conhecido da amostra em placas de Petri previamente secas e pesadas. A amostra foi submetida a secagem por 24 horas em estufa a 60°C e pesada posteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata. (JESUINO, 2019). Os dados estão apresentados no Apêndice A.1.1.

4.4.2. Determinação de Riboflavina

Para análise da concentração de RF nas amostras, uma alíquota foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga HETTICH®, UNIVERSAL 320R (Kirchlengern – VE, Alemanha) (PEDROLLI et al., 2015a). O sobrenadante foi coletado e separado para análise.

4.4.2.1. Fluorescência

As amostras foram adicionadas em placas de 96 poços e a unidade de fluorescência (UF) foi medida em leitor de placas PERKINELMER ENSPIRE® , *Multimode Plate Reader* (Waltham - MA, USA) em comprimento de onda de excitação da molécula de 444 nm e de emissão de fluorescência de 520 nm (ABBAS; SIBIRNY, 2011). A reta padrão para calibração foi realizada com *Riboflavina* 98%, Sigma Aldrich (San Luis – MI, EUA). Os dados estão apresentados no Apêndice A.1.2.

4.4.2.2. HPLC

A análise de concentração de RF por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada utilizando aparelho SHIMADZU, com controladora CBM20A, bomba NexeraXR LC20AD, fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, coluna Poroshell 120 ECC18 (tamanho de partícula 2,7 um, 50 x 3 mm), utilizando como fase movel 18% (v/v) de metanol - 20 mM de ácido fórmico - 20 mM de formato de amônio (pH 3,7) (PEDROLLI et al., 2015a). A detecção da RF foi realizada em 445 nm (ABBAS; SIBIRNY, 2011). A reta padrão para calibração foi realizada com Riboflavina 98%, Sigma Aldrich (San Luis – MI, EUA). Os dados estão apresentados no Apêndice A.1.3.

4.4.3. Determinação da concentração de Açúcar.

As concentrações de sacarose do meio de cultura foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando aparelho

SHIMADZU, com controladora CBM20A, bomba NexeraXR LC20AD, fluxo de 0,6 mL/min, coluna Aminex® HPX-87P, utilizando água como fase móvel, tempo de corrida de 20 minutos, detector RID 20A, temperatura de 80°C e volume de injeção da amostra de 20 µL (injeção manual) (JESUINO, 2019). Os dados estão apresentados no Apêndice A.1.4.

4.4.4. Determinação da concentração de CO₂ e O₂.

As concentrações de CO₂ e O₂ do processo de cultivo com *B. subtilis* foram analisadas em tempo real através medidor de gás BlueInOne, BlueSens (Herten, Alemanha).

4.4.5. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$).

A velocidade específica de crescimento foi definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 4.1.

$$\frac{d(Cx.V)}{dt} = \mu.Cx.V \quad \text{Equação 4.1}$$

Na fase exponencial do crescimento $\mu = \mu_{\text{máx}}$ portanto, após integrar e reorganizar a Equação 4.1, a velocidade específica de crescimento pode ser calculada através da Equação 4.2.

$$\ln Cx/Cx_0 = \mu_{\text{máx}} . t \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde Cx_0 (g.L⁻¹) é a concentração celular no tempo zero e t é o tempo de cultivo (JESUINO, 2019).

4.4.6. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$).

Para o cálculo do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$) (g.g⁻¹) será utilizada a Equação 4.3.

$$Cx - Cx_0 = Y_{x/s} . (Cs_0 - Cs) \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde Cx_0 (g/L) é a concentração celular no tempo zero, Cs_0 (g.L⁻¹) é a concentração inicial do substrato, e Cx (g.L⁻¹) e Cs (g.L⁻¹) são as concentrações celular e de substrato, respectivamente, variando com o tempo.

A partir do cálculo do consumo de sacarose e da produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, é possível calcular o valor do $Y_{x/s}$ (g.g^{-1}) (JESUINO, 2019).

4.4.7. Determinação da produção específica ($Y_{p/x}$), ($Y_{p/s}$) e produtividade (Pr).

Para o cálculo da produção específica ($Y_{p/x}$) (g.g^{-1}) ou ($Y_{p/s}$) (g.g^{-1}) e produtividade (Pr) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram utilizadas as Equações 4.4, 4.5 e 4.6 respectivamente.

$$Y_{p/x} = \frac{Cp - Cp_0}{Cx - Cx_0} \quad \text{Equação 4.4}$$

$$Y_{p/s} = \frac{Cp - Cp_0}{Cs - Cs_0} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$Pr = Cp/t \quad \text{Equação 4.6}$$

Onde Cp (g.L^{-1}) é a concentração de RF. (JESUINO, 2019).

4.5. Análise estatística

O Delineamento de Composto Central (DCC) foi realizado a fim de avaliar se a concentração de FeSO_4 apresenta interferência estatisticamente significativa na produção de RF por *B. subtilis*. O experimento foi realizado com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes empregadas foram a concentração de FeSO_4 (X1) e tempo de cultivo (X2). Todos os ensaios foram conduzidos em mesa incubadora rotativa e o cálculo estatístico dos dados obtidos foi realizado utilizando-se o software Statística®. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento realizado.

Tabela 7: Matriz Delineamento de Composto Central (DCC) de duas variáveis.

Corrida	Variáveis	
	FeSO ₄ (X ₁)	Tempo (X ₂)
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	-1,41421	0
7	+1,41421	0
8	0	-1,41421
9	0	+1,41421
10	0	0
11	0	0

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo em Frascos de *Erlenmeyers*.

Inicialmente um cultivo em frascos de *Erlenmeyers* (500 mL) foi realizado em 200 rpm a 37°C para analisar o perfil cinético de crescimento do microrganismo, assim como sua produção de RF e consumo de substrato. Os resultados são apresentados nas Figuras 8 e 9. As análises de concentração de RF foram realizadas por Fluorimetria em placa de 96 poços.

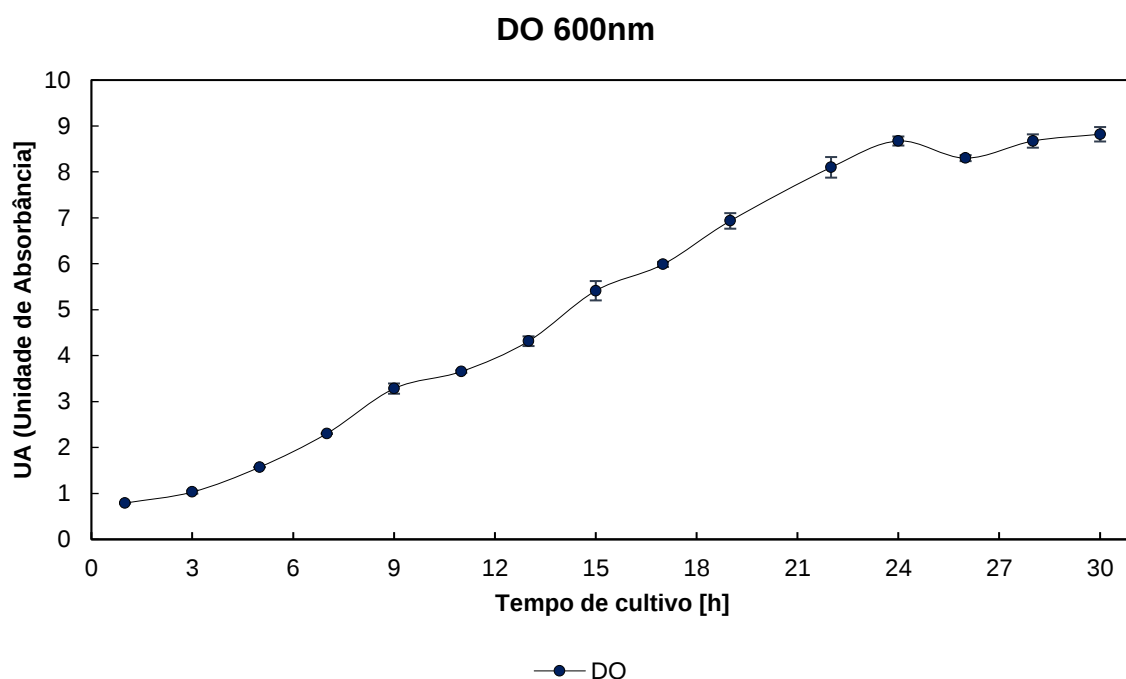


Figura 8: Gráfico da curva de crescimento celular de cultivo realizado em Frasco de Erlenmeyer.

Nota-se que a partir de 5 horas de cultivo o microrganismo entra em processo de crescimento exponencial e se estabiliza a partir de 24 horas, atingindo uma DO de 8,67 UA.

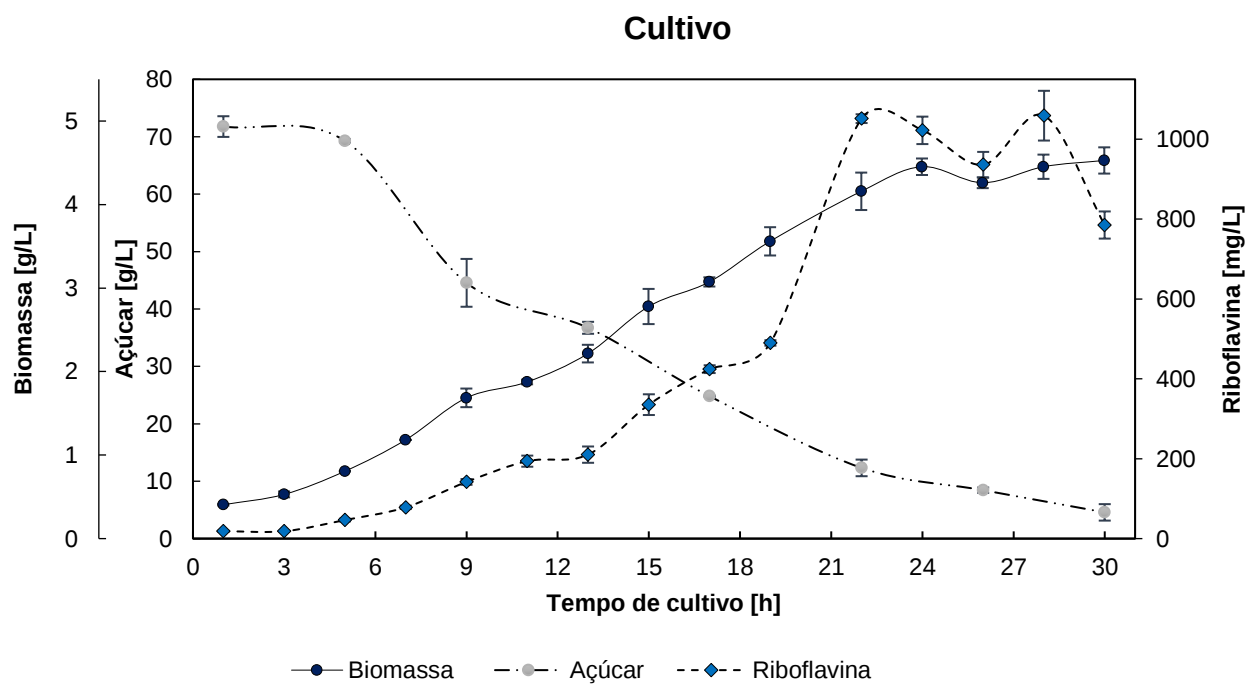


Figura 9: Gráfico das curvas de Crescimento celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar em cultivo realizado em Frasco de Erlenmeyer.

A produção de RF apresenta um aumento a partir de 15 hora de cultivo, outro ponto a se levar em consideração é a queda na concentração de RF a partir de 24 horas de cultivo, indicando alguma degradação da amostra.

A produção máxima de RF observada foi de 1058,9 mg/L, resultado eximamente satisfatório quando comparado com outros cultivos em erlenmeyers descritos na literatura, como no caso do HEMIDA e colab., 2016 que obtiveram uma produção de RF de 288,33 mg/L em erlenmeyer a 200 rpm e 30°C. ORAEI e colab., 2018 realizaram cultivos utilizando uma cepa de *B. subtilis* selvagem em Shaker agitado 200 rpm a 30°C por 72h, atingindo uma produção de 11,73 mg/L. Com isso nota-se a grande diferença de produção causada pela modificação genética do microrganismo, onde obtivemos um resultado quase 90x superior ao descrito por HEMIDA. Assim a combinação da modificação genética com a otimização dos parâmetros operacionais, torna-se uma estratégia eficaz para o aumento no rendimento da produção de RF.

5.2. Cultivo em frascos de *Erlenmeyer* com adição de Semi-helicoides.

Para analisar o comportamento do microrganismo sobe maiores taxas de transferência de oxigênio, foi realizado um cultivo com frascos de *erlenmeyers* contendo semi-helicoides acoplados como apresenta a Figura 10 (Dados específico dos semi-helicoides não podem ser fornecido, pois este é um projeto paralelo em parceria com a UNICAMP que está em processo de pedido de patente).



Figura 10: Modelo dos semi-helicoides acoplados ao frasco de Erlenmeyer. (Autor).

Os resultados foram comparados com um cultivo em frascos de erlenmeyer padrão e estão apresentados nas Figuras 11 e 12, onde foram

analisados a partir de 15 horas de cultivo tempo em que a produção de RF começa a se destacar como mostrado no cultivo anterior.

Biomassa

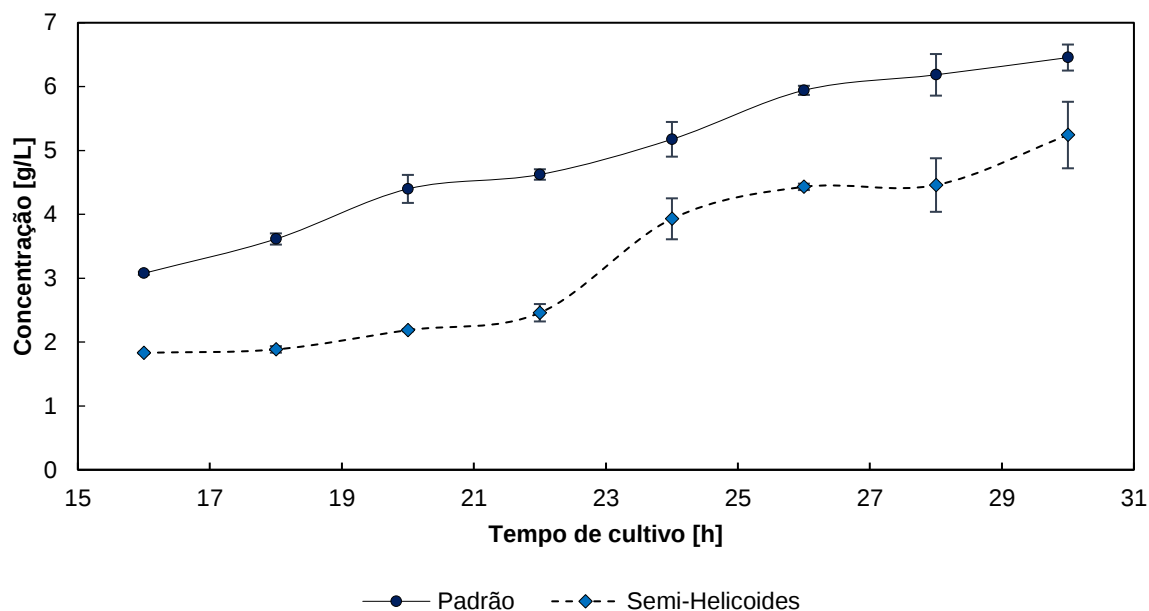


Figura 11: Gráfico das curvas de crescimento celular dos cultivos realizado em Frascos de Erlenmeyer com e sem a adição de semi-helicoides.

Riboflavina

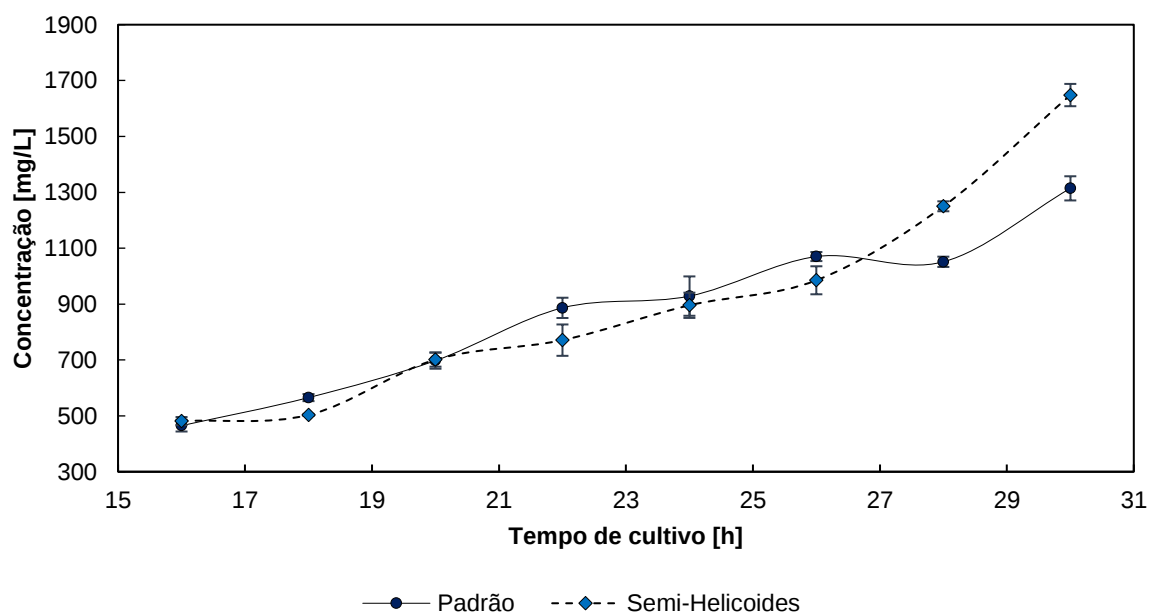


Figura 12: Gráfico das curvas de produção de Riboflavina dos cultivos realizado em Frascos de Erlenmeyer com e sem a adição de semi-helicoides.

De acordo com os dados o perfil de crescimento do microrganismo no processo de cultivo com a adição de semi-helicoides foi inferior ao padrão, entretanto a produção de RF foi praticamente semelhante até as 26 horas de cultivos tendo um salto após esse período. Isso mostra a influência que os parâmetros de transferência de massa e oxigênio possuem sobre a produtividade, atingindo uma produção de 1648 mg/L de RF com a adição de semi-helicoides. Estes resultados são bem promissores para o aumento de escala quando comparado com a literatura, como no caso do SHI e colab., 2009 que inicialmente obtiveram uma produção de RF com cerca de 230 mg/L em cultivo realizado em *erlenmeyer* de 500 mL a 240 rpm e 41°C, tendo um salto para 15 g/L na produção de RF quando operado em um biorreator STR de 5L em modo batelada alimentada.

Com a obtenção destes dados os parâmetros escolhidos para o primeiro cultivo em biorreator foram determinados, buscando-se altas taxa de transferência de massa e oxigênio.

5.3. Cultivo em STR.

O primeiro cultivo em reator STR foi operado com 800 rpm visto que o microrganismo aumenta a produção de RF sob estresse como observado no ultimo cultivo em *erlenmeyers* com adição de semi-helicoides. Foi selecionada uma vazão de 0,5 vvm, com um volume de operação de 4 L para melhor controle do processo de espuma. Os demais parâmetros foram mantidos padrões, sendo temperatura em 37°C e o controle de pH em 7,0 com uma variação de $\pm 0,1$. O cultivo em biorreator foi realizado em modo de operação batelada utilizando-se meio MP, foi preparado um inóculo como descrito no item 4.3.5.3 que foi utilizado para inocular o reator em quantidade suficiente para obtenção de DO_{600nm} inicial de 1,0 com uma variação de $\pm 0,5$.

A Figura 13 apresenta a comparação entre as curvas de crescimento celular, produção de RF e consumo de açúcar.

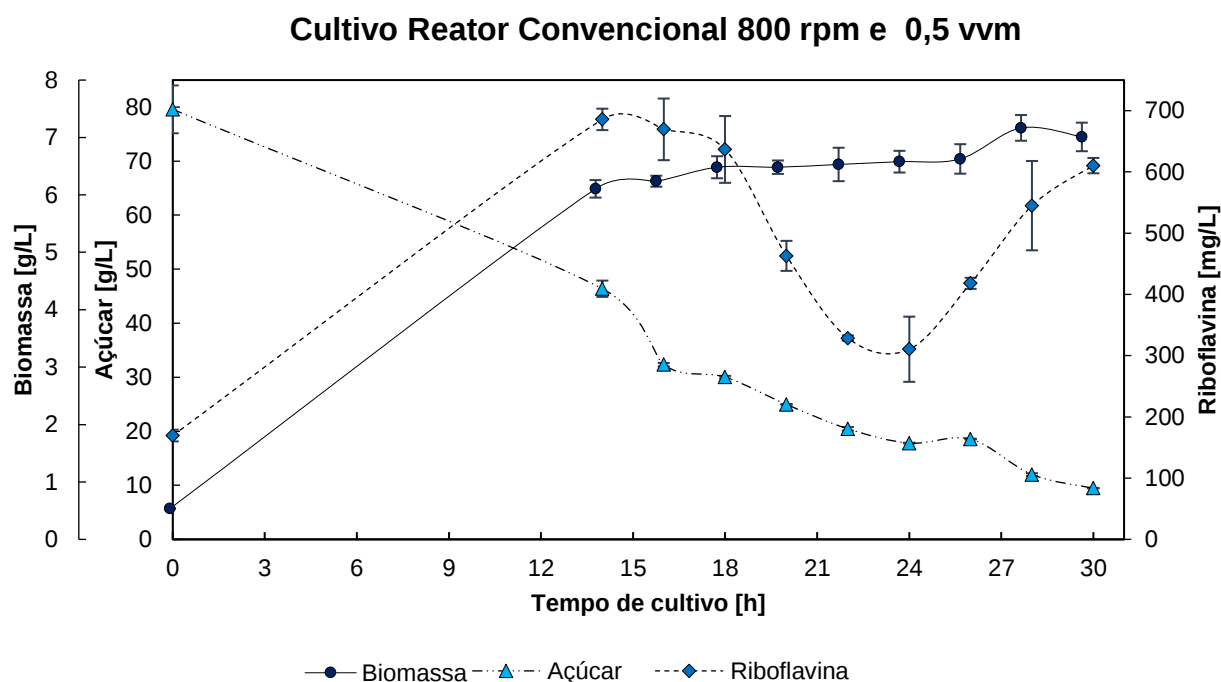


Figura 13: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 800 rpm, 4 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

A partir dos resultados apresentados pôde-se observar que a resposta para o comportamento cinético foi diferente do previsto, nos cultivos em erlenmeyer levava em torno de 24h para começar a entrar na fase estacionária e a produção de RF passava a ser notável entorno de 15h após o início do cultivo. Sendo programado a coleta das amostras para este primeiro cultivo em biorreator após esse período de 15h, porém no cultivo em biorreator a fase exponencial aparenta ter sido nessas primeiras 15h horas juntamente com o pico de produção de RF de 685 mg/L que foi observado após 14h de cultivo seguido de um caimento na concentração de RF indicando uma degradação da amostra.

Nota-se que a alta agitação e consequentemente uma alta transferência oxigênio promoveu um maior crescimento bacteriano quando comparado aos cultivos em erlenmeyers. Já no caso da produção de RF houve uma inversão, resultando em uma produção inferior especialmente se comparado ao cultivo em erlenmeyer com adição de semi-helicoides, o qual atingiu uma concentração máxima de RF de 1.648 mg/L.

No caso do biorreator, pode indicar uma possível alteração na rota metabólica do microrganismo focando no crescimento celular em depreciação da produção de RF. A literatura relaciona esse efeito com o metabolismo de Purina,

descrevendo que a expressão gênica de purina, onde sob condição de transferência de oxigênio mais baixas esses genes são regulados de forma mais eficiente (HU et al., 2017).

Partindo-se dos resultados anteriores descritos, foi planejado outro cultivo em biorreator em modo de operação batelada com a diminuição da agitação para 400 rpm a fim de avaliar-se a influência da taxa de agitação junto com aeração. Outro parâmetro alterado foi o volume de operação para 5L, visto que, o controle do nível do biorreator que é alterado pela produção de espuma ter sido controlável e por ser hidrodinamicamente mais ideal. Demais parâmetros como vazão, temperatura e pH foram mantidos, a Figura 14 abaixo apresenta os resultados obtidos do cultivo.

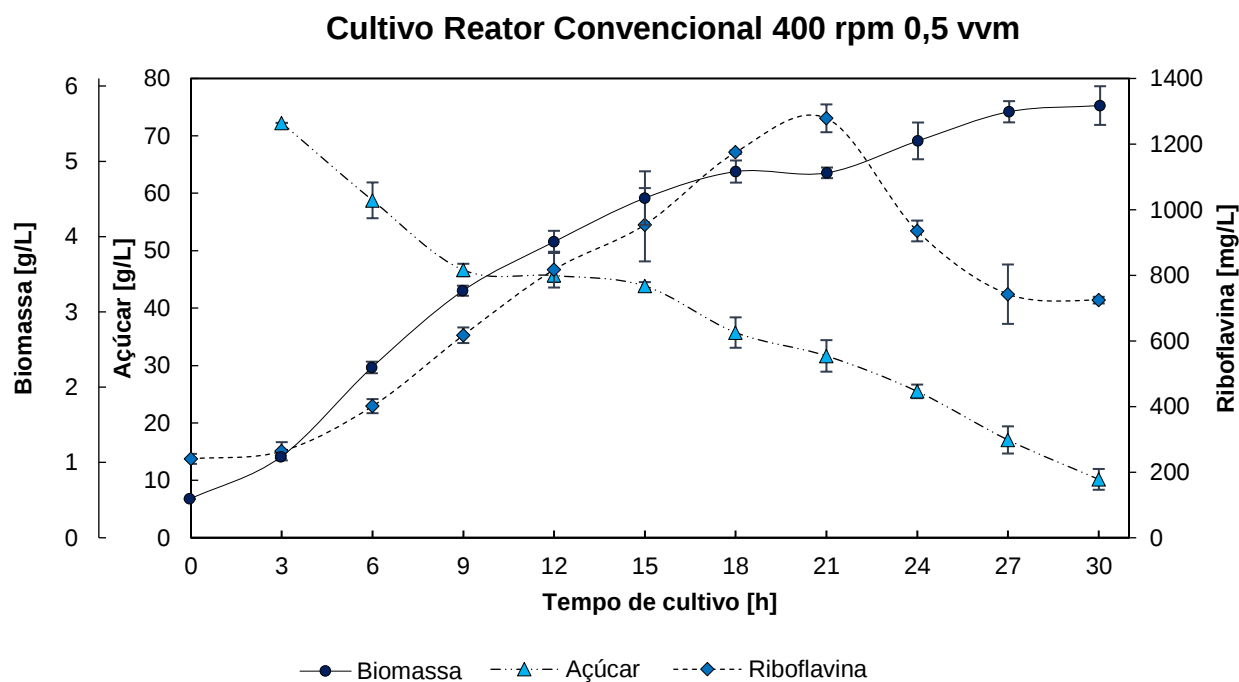


Figura 14: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 400 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

A partir dos resultados apresentados pode-se observar que a diminuição na agitação trouxe ganhos com relação a produção de RF atingindo 1.278 mg/L em 21h de cultivo, outro ponto observado foi o crescimento celular mais lento em comparação ao cultivo em 800 rpm seguindo o mesmo perfil apresentado nos cultivos de comparação realizados entre os frascos de erlenmeyers com e sem a adição de semi-helicoides, no qual o cultivo com os semi-helicoides resultou em um

crescimento celular mais lento e menor em comparação padrão, porém sua produção foi mais satisfatória.

Apesar do resultado inicial promissor com o aumento da produção de RF em biorreator com a redução da agitação para 400 rpm os resultados ainda não foram suficientes para superar a produção observada em erlenmeyer. Outro problema a se levar em consideração é diminuição na concentração de RF após 21h de cultivo, indicando que existe algum fator de degradação prejudicando a produção de RF.

Durante o processo de cultivo foi notado um alto consumo de ácido para o controle de pH, a primeira reposição foi realizada após 18h de cultivo com uma concentração de H_2SO_4 2,0 M sendo essa concentração o dobro do usualmente utilizado. Ao final do cultivo (30h) notou-se o esgotamento do ácido novamente, indicando uma possível alteração na rota metabólica do microrganismo que ocasiona na produção de alguma substância alcalina durante o processo de produção de RF.

Os resultados observados nos cultivos sugerem que uma transferência de oxigênio excessiva, faz com que o microrganismo priorize o crescimento em detrimento da produção de RF, com isso, outro cultivo em biorreator em modo batelada foi realizado alterando sua agitação para 200 rpm e mantendo os demais parâmetros do cultivo anterior. A Figura 15 abaixo apresenta a comparação entre as curvas de crescimento celular, produção de RF e consumo de Açúcar.

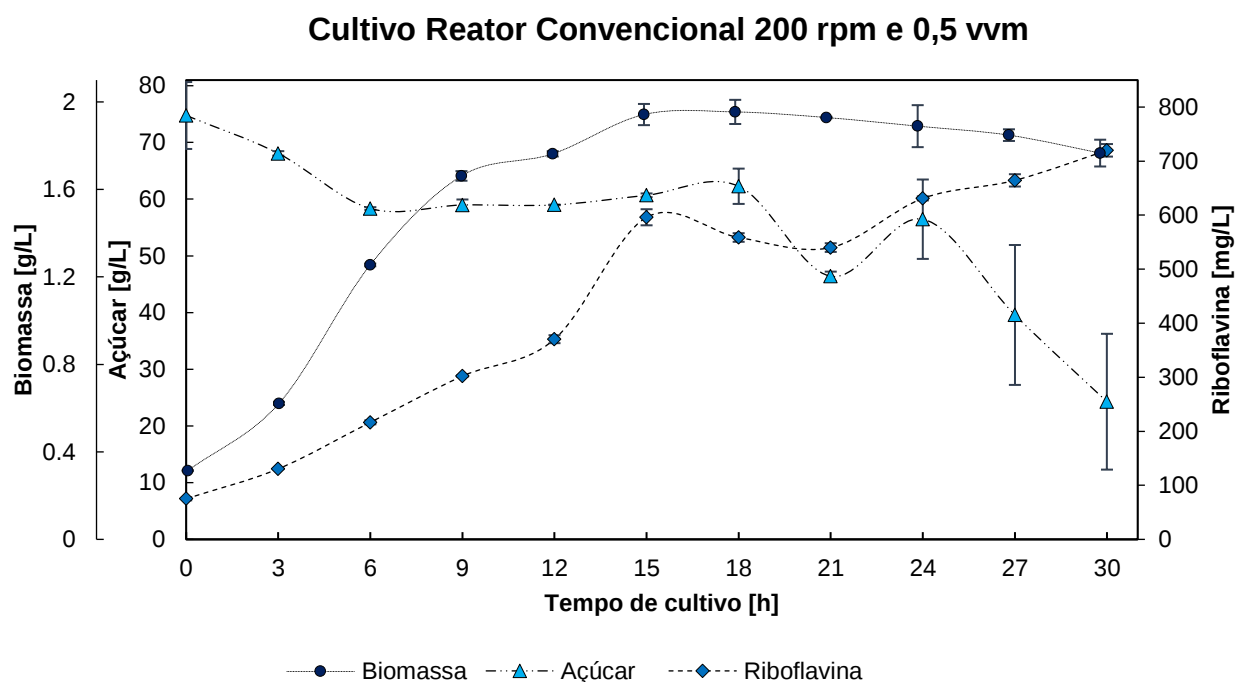


Figura 15: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 200 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

De acordo com os dados apresentado, observa-se que o crescimento celular foi bastante afetado possivelmente devido à falta de oxigênio provocado pela baixa transferência quando operado a 200 rpm. Nota-se que houve uma diminuição na produção de RF com um pico máximo de 719 mg/L após 30h de cultivo, outro ponto importante observado foi que durante o cultivo não houve degradação significativa da amostra e o consumo de ácido para o controle de pH foi padrão.

Como observado nos cultivos acima apresentados a transferência de oxigênio provou ser um fator de extrema importância, modificando completamente o comportamento de crescimento do microrganismo e produção de RF. Com isso foi realizado outro cultivo em modo batelada modificando a agitação para 300 rpm, outro parâmetro alterado foi o tempo de cultivo de 30h para 60h. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 16.

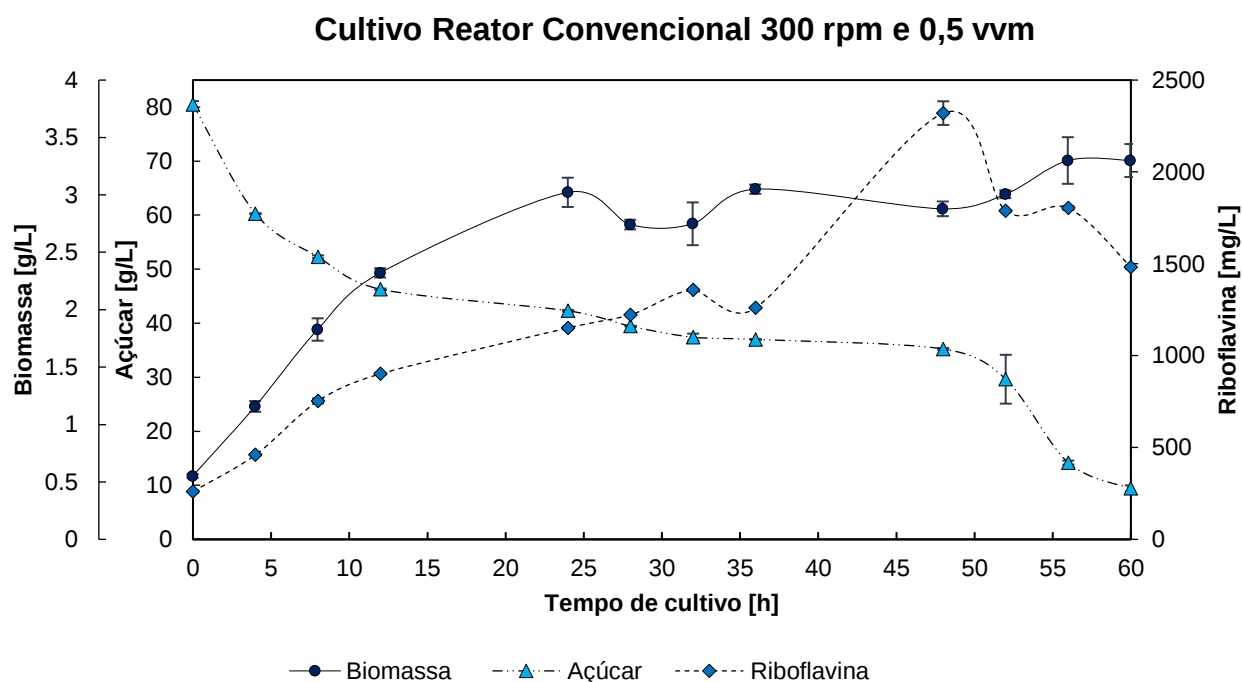


Figura 16: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 300 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

O cultivo alcançou a produção máxima de RF de 2.320 mg/L em 48h de cultivo, produção bastante superior ao obtido nos demais cultivos. Com relação ao perfil de produção, ponto ideal se assemelha ao descrito por Abd-alla et al. (2016) alcançando a produção ideal de RF após 48h de cultivo. Apesar do tempo de cultivo mais estendido, nota-se que o processo de diminuição na concentração de RF provocado por degradação da amostra ocorreu após 48h de cultivo, enquanto nos cultivos de 400 e 800 rpm esse processo ocorreu em menos de 30h.

Esse processo de degradação pode estar ocorrendo devido à falta de algum nutriente utilizado para o crescimento do microrganismo fazendo o metabolismo mudar a produção, e com isso degradar a RF para usar no seu crescimento. Um dos possíveis nutrientes que pode estar causando esse efeito é a falta de Ferro, pois flavinas reduzidas podem agir reduzindo o ferro, de modo que ele não fique disponível para o metabolismo do microrganismo (SOUZA et al., 2005).

Um meio de contornar esse problema seria alterar o processo de cultivo para modo batelada alimentada, com isso suprindo a falta de algum possível nutriente e mantendo a produção constante.

Outro ponto importante novamente observado foi o alto consumo de ácido para o controle de pH, onde a primeira troca com H_2SO_4 2,0M foi realizada após 32h

de cultivo e segunda troca sendo feita depois de 48h de cultivo. Esse intervalo de tempo em que houve o maior consumo de ácido para o controle do pH também foi onde observou-se a maior inclinação no gráfico de produção da RF.

Outro cultivo em 300 rpm foi realizado com o intuito de avaliar a semelhança do perfil de crescimento e produção do microrganismo, a Figura 17 apresenta a comparação dos resultados entre os 2 cultivos realizados em 300 rpm. Os resultados de consumo de açúcar não foram apresentados, pois houve problemas na análise das amostras do 2º cultivo.

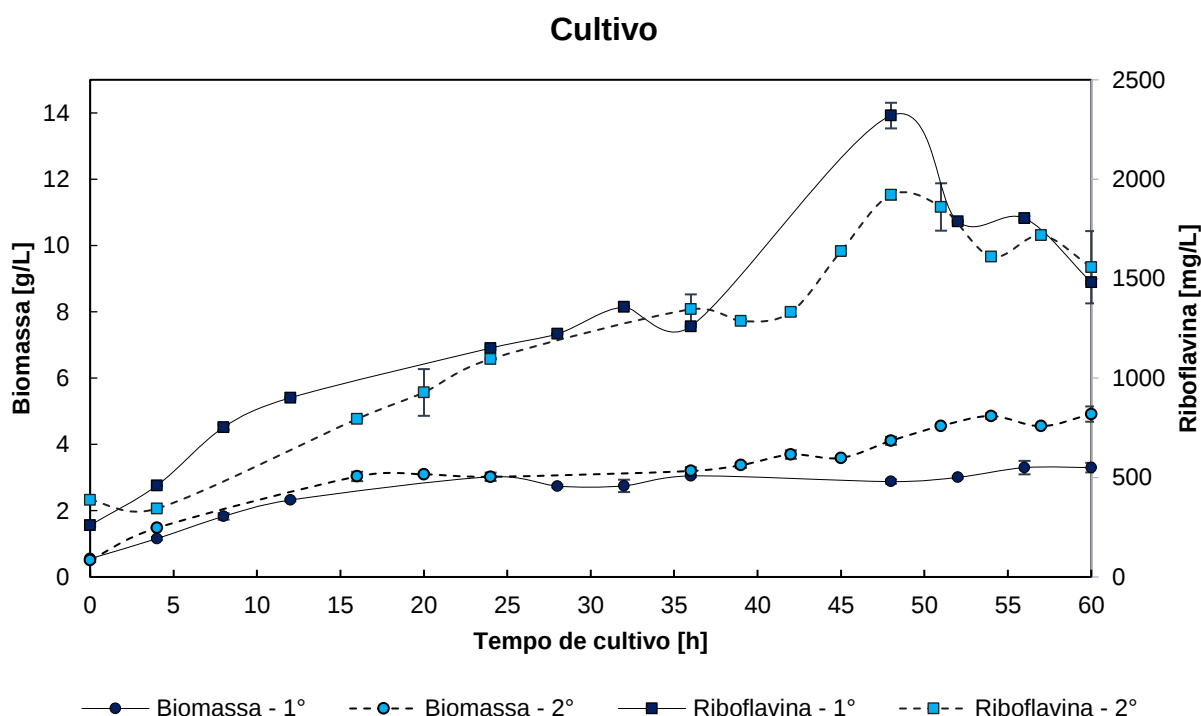


Figura 17: Gráfico da comparação das curvas de Crescimento Celular e Produção de Riboflavina do cultivo realizado em biorreator STR em modo batelada a 300 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

De acordo com os resultados houve uma redução na produção de RF no 2º cultivo, atingindo uma produção de 1.922 mg/L. Entretanto ambos os cultivos apresentam o mesmo perfil de produção, onde até 36 h de cultivo seguem uma inclinação semelhante seguida de um salto de produção. O 2º cultivo apresenta um certo atraso no salto de produção, sendo partir de 42 h de cultivo, porém esse atraso pode ser justificado pelo fato de que no 1º cultivo não houve pontos entre 36h e 48h. Por fim, nota-se que ambos os cultivos também demonstraram o mesmo perfil de degradação da amostra.

Com relação a diferença de produção entre os 2 cultivos, pode ser justificada devido a um maior crescimento celular no 2º cultivo. Levando em

consideração sistemas de cultivos com parâmetros semelhantes, esse efeito foi observado no cultivo em erlenmeyers com e sem a adição de semi-helicoides, onde o cultivo que apresentou maior densidade celular foi o que resultou em uma menor produtividade.

5.4. Análise do efeito do ferro na degradação da Riboflavina.

O planejamento fatorial em processos fermentativos permite a avaliação conjunta de diversas variáveis, suas interações e efeitos individuais com um número reduzido de ensaios. Com o objetivo de avaliar se a concentração de FeSO_4 disponível no meio de cultura está relacionada a degradação da RF, observada no final dos cultivos realizados. Foi realizado um Delineamento de Composto Central (DCC) com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes empregadas foram a concentração de FeSO_4 (X1) e tempo de cultivo (X2), como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Variáveis analisadas no planejamento experimental DCC.

Variáveis independentes	-1	0	+1
FeSO_4 (X1)	2 mg/L	6 mg/L	10 mg/L
Tempo (X2)	20 h	40 h	60 h

Neste estudo, os cultivos foram realizados em *Erlenmeyers* de 500 mL a 220rpm e 37°C. A Tabela 9 apresenta o projeto experimental DDC e a produção de RF correspondente.

Tabela 9: Valores das variáveis do DCC e o resultado experimental obtido na produção de Riboflavina. Obs: © é o Ponto central.

Amostra	FeSO_4 [mg/L]	Tempo [h]	Riboflavina [g/L]
1	2	20	1,726
2	2	60	2,472
3	10	20	1,902
4	10	60	2,782
5 ©	6	40	2,407
6	0,3	40	2,167
7	11,7	40	2,915
8	6	11,7	0,060
9	6	68,3	2,903
10 ©	6	40	2,726

11 ©	6	40	2,548
------	---	----	-------

A superfície de resposta foi plotada com base na equação ($z = -0,89166942472348 - 0,0006544661460025 * x + 0,0026765798611111 * x^2 + 0,13016866283165 * y - 0,0012174547222222 * y^2 + 0,00041924791666666 * x * y$) para entender se a concentração de FeSO_4 possui relação com a degradação da RF, sendo apresentada na Figura 18. De acordo com os resultados observados, pode-se concluir que a concentração de FeSO_4 não tem influência na degradação da RF, pois ao observar a variação dos pontos no eixo X não é notado uma variação significativa. Já a variação no eixo Y, os resultados demonstram ser mais significativos.

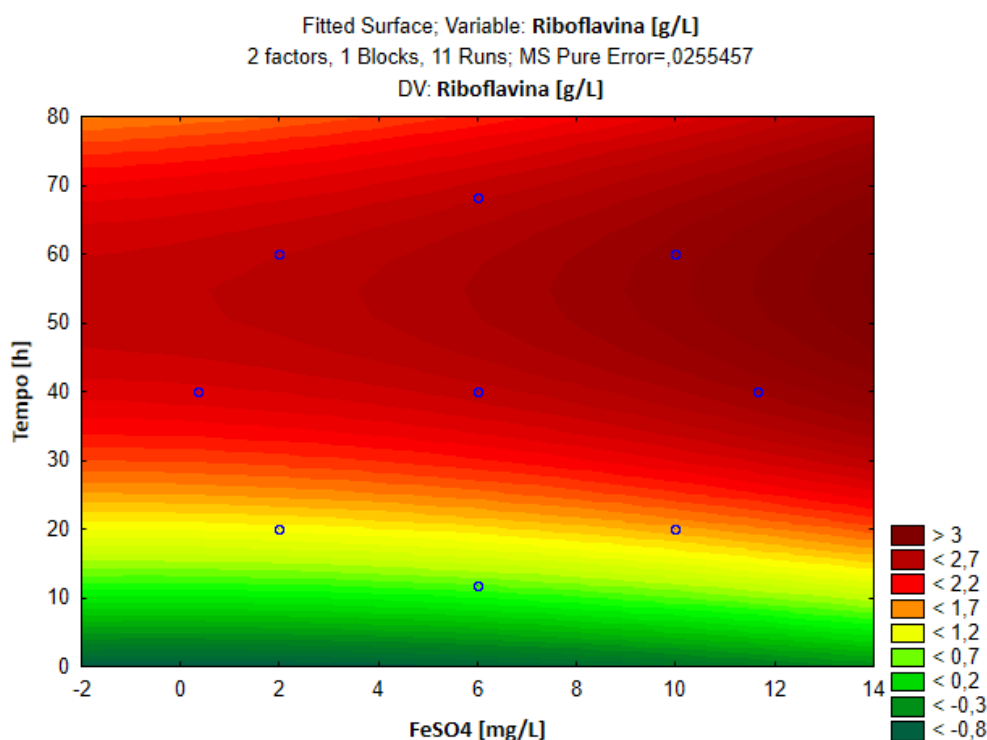


Figura 18: Gráfico de superfície 2D plotado através dos dados obtidos do DCC.

O gráfico de Pareto, que tem sido utilizado como uma ferramenta útil para identificar os efeitos mais importantes em sistema, visto que com sua aplicação é possível determinar os fatores significativos. Neste gráfico, o comprimento de cada barra em um gráfico de Pareto padronizado é proporcional ao valor absoluto

associado ao seu coeficiente de regressão ou efeito estimado (ORAEI; RAZAVI; KHODAIYAN, 2018).

A Figura 19 mostra o gráfico de Pareto para produção de RF. Os resultados comprovam que a concentração de FeSO_4 não possui influência aparente na degradação da RF ($p > 0,05$). Isso indica que a redução na concentração de RF pode estar relacionada a outro fator.

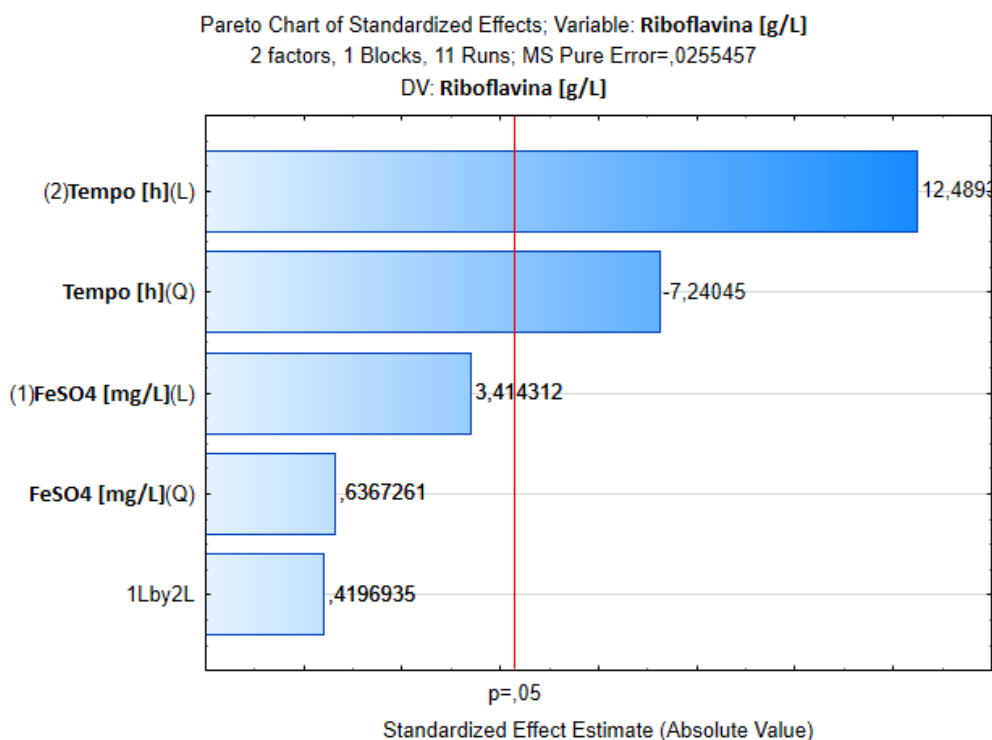


Figura 19: Gráfico de Pareto do DCC para produção de Riboflavina ($\alpha=0,05$).

5.5. Análise precipitação da Riboflavina em biorreator STR.

Com o intuito de avaliar se durante os cultivos estava ocorrendo a precipitação da RF, foi realizado outro cultivo em biorreator STR a 400 rpm. Durante o cultivo a metodologia de coleta da amostra foi alterada, onde foi realizado primeiro a diluição das amostras seguido da centrifugação. Durante o cultivo foi realizado também a análise das concentrações de dióxido de carbono e oxigênio. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos.

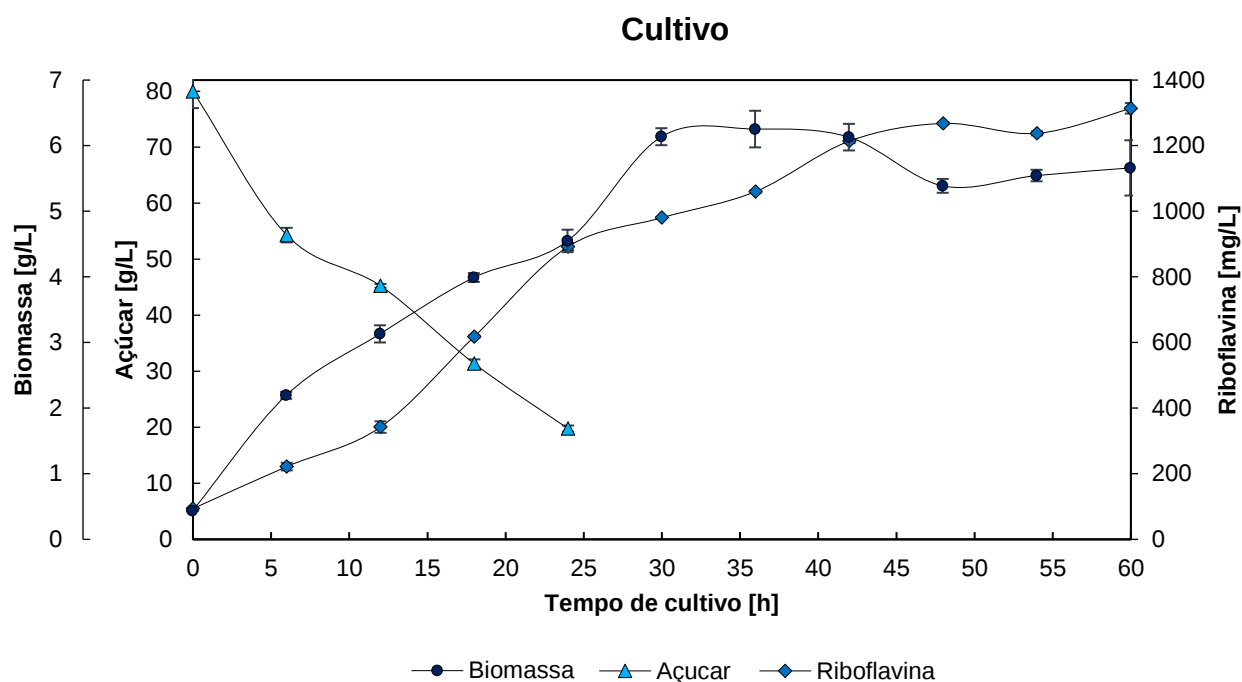


Figura 20: Gráfico das curvas de crescimento Celular, Produção de Riboflavina e Consumo de açúcar de cultivo realizado em Biorreator STR em modo batelada a 400 rpm, 5 L, 0,5 vvm e pH controlado em 7.

De acordo com o gráfico nota-se que a alteração na metodologia de coleta da amostra foi satisfatória, visto que durante o processo de cultivo não houve uma redução na concentração da RF, como foi observada nos demais cultivos. No 1º cultivo realizado em 400 rpm esse efeito de redução se mostrou presente em menos de 30h. Durante as análises do consumo de açúcar, não foi possível realizar a detecção da concentração de açúcar no meio a partir de 30h de cultivo, devido alta quantidade de interferentes e baixa concentração de açúcar indicando o esgotamento do substrato. Esse esgotamento pode ser confirmado quando analisamos a concentração de CO₂ apresentada na Figura 21, observa-se que após 30h de cultivo ela apresenta uma queda bastante significativa na respiração celular devido à falta de substrato.

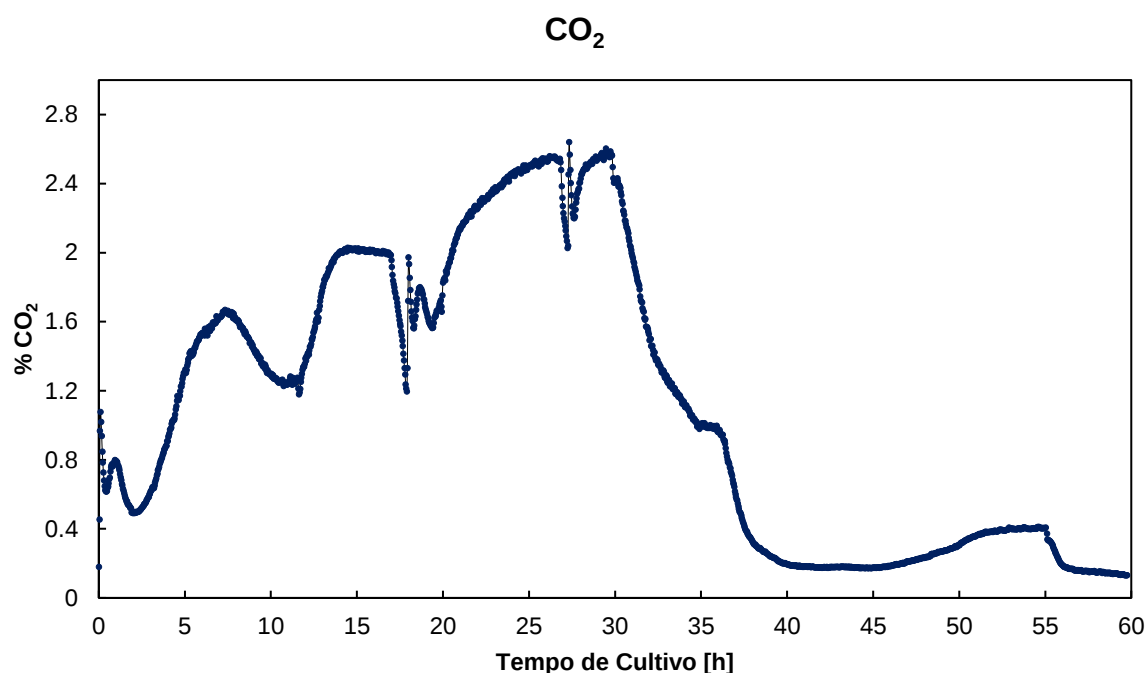


Figura 21: % de CO₂ emitido no processo de cultivo em batelada operado a 400 rpm.

5.6. Parâmetros cinéticos

Através da análise dos parâmetros cinéticos é possível compreender o processo e os fatores que possuem influencia no crescimento e produção do microrganismo. A Tabela 10 abaixo apresenta os resultados dos cultivos realizados em biorreator STR para comparação.

Tabela 10: Concentrações máximas de biomassa, Riboflavina e parâmetros cinéticos dos reatores realizados nas rotações de 800 rpm, 400 rpm, 300 rpm e 200 rpm.

Agitação (rpm)	Biomassa (g/L)	Concentração de Riboflavina (mg/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{p/x}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Produtividade (mg/L.h)
800	7,17	685,78	0,174	0,0927	0,105	0,011	48,98
400 – 1°	5,82	1278,54	0,171	0,2397	0,1015	0,0148	60,88
400 – 2°	5,81	1313,89	0,147	0,237	0,0713	0,0109	21
300 – 1°	3,3	2320,09	0,088	0,8850	0,0473	0,0242	48,34
300 – 2°	4,91	1981,92	0,09	0,4256	---	---	40,03
200	1,95	719,99	0,148	0,4441	0,0114	0,0166	24

Observando os resultados apresentados nota-se um perfil de redução na concentração de biomassa total entre os cultivos realizados, demonstrando uma relação direta entre a taxa de agitação operada com a expressão celular. Hu et al. (2017) descrevem que em taxas de maior transferência de oxigênio o fluxo do

consumo da fonte de carbono na rota metabólica é maior pela via PP, o que contribui para a alta taxa de crescimento, visto que a via PP oferece precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos essenciais para o crescimento celular.

Ao comparar a produção específica ($Y_{p/x}$) dos cultivos realizado em 300 rpm nota-se uma variação significativa de cerca de 0,4594 g/g de diferença, isso devido ao fato do 2º cultivo ter apresentado 1,61 g/L a mais na concentração de Biomassa. Porém, quando analisamos a produtividade a variação não é tão significativa, sendo cerca de 8,31 mg/L.h de diferença.

Dentre as 4 configurações de operação as que mais se destacam foram os cultivos em 300 e 400 rpm, os quais apresentaram maior produção de RF sendo uma média de 1296,22 mg/L em 400 rpm, e em média de 2151,0 mg/L para os cultivos em 300 rpm. Quando comparados em relação aos parâmetros cinéticos os cultivos operados a 300 rpm demonstram uma relação da produção específica ($Y_{p/x}$) em média de 0,6553 g/g, sendo quase 2,7x maior em relação ao obtido no cultivo operado em 400 rpm. Apesar dessa diferença expressiva na produção específica de RF entre as condições operacionais, quando levamos em consideração a produtividade o cultivo operado a 400 rpm se destaca atingindo uma produção de 60,88 mg/L.h de RF, entretanto, ao analisar a relação do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$) o cultivo a 300 rpm apresentou uma relação de 0,039 g/g sendo quase 2,5x menor em comparação ao de 400rpm.

O fato da expressão de RF não acompanhar a taxa de formação de biomassa de forma proporcional sugere que o aumento na taxa de transferência de oxigênio gerada pelo aumento de agitação faça com que o microrganismo priorize o crescimento celular. De acordo com a literatura esse efeito pode estar relacionado com o metabolismo de Purina, onde de acordo com a literatura a expressão gênica de purina reduz no decorrer do bioprocesso, afetada pela redução na concentração da fonte de carbono e disponibilidade de oxigênio, onde sob condição de transferência de oxigênio mais baixas esses genes são regulados de forma mais eficiente (HU et al., 2017). Com isso, é possível justificar a redução na expressão de RF nos cultivos operados a 400 e 800 rpm, que apresentam maiores taxas na transferência de oxigênio e consequentemente maior crescimento celular e consumo do substrato.

Já para o cultivo de 200 rpm a transferência de oxigênio parenta ter sido inferior a demanda do microrganismo, a qual, prejudicou a produção de RF visto que o modelo de cultivo aprestou menor taxa de produtividade sendo de 24 mg/L.h.

De acordo com os parâmetros cinéticos o cultivo realizado em 300 rpm, foi o que obtive o melhor rendimento, atingindo um $Y_{p/s}$ de 0,0242 g/g. Comparando a produção com literatura, Man et al. (2014) também realizaram análises a respeito da influência da agitação na produção de RF. Obtendo bons rendimentos com um cultivo operado a 600 rpm, porém no decorrer do cultivo com a mudança da reologia do meio foi necessário o aumento da agitação para manter a transferência de oxigênio ideal, com isso o autor utilizou uma estratégia de cultivo em multiestágio variando a taxa de agitação no decorrer do processo. Conseguindo uma produção de RF de 9,4 g/L em 48h tendo um rendimento de $Y_{p/s}$ de 0,051 g/g. Ao comparar esse rendimento com o obtido, nota-se que o rendimento é inferior, porém vale destacar que o modo de operação é diferente, sendo em batelada alimentada, tendo um grande impacto na produtividade como mostra (DEBABOV et al., 1997; LEE et al., 2004b; PERKINS et al., 1999).

Na literatura quase não se encontra trabalhos que descrevem cultivos de *B. subtilis* para produção de RF em modo batelada, o único trabalho encontrado foi uma patente de 1997, na qual, o autor conseguiu produzir 1,05 g/L de RF em um biorreator STR operado a 700 rpm com 72h de cultivo (USUI; YAMAMOTO; NAKAMATU, 1997). Demonstrando que os resultados obtidos no presente trabalho com o microrganismo modificado geneticamente juntamente com o estudo a respeito do efeito da agitação, são promissores fornecendo uma boa base para estudos com novas estratégias de produção, como por exemplo o modo batelada alimentada.

6. CONCLUSÃO.

Com relação aos cultivos em Frasco *Erlenmeyer* nota-se que a adição de semi-helicoides proporcionou um aumento na transferência de massa e oxigênio, o que resultou no aumento da produtividade do microrganismo. A produção em biorreatores seguiu o mesmo perfil observado nos cultivos em erlenmeyers, onde podemos concluir que a transferência de massa e oxigênio demonstrou ser um parâmetro extremamente importante. Dentre as variações testadas a configuração que apresentou melhor rendimento foi a operada em 300 rpm. Os resultados de produção obtidos se mostram promissores, comprando com o observado na

literatura (AVERIANOVA et al., 2020; DMYTRUK et al., 2014; ZAMBONI et al., 2003).

A respeito do fator que está provocando a redução na concentração de RF, demonstrando um maior impacto nos cultivos com alta agitação. Podemos concluir que a concentração de FeSO_4 no meio de cultivo não é o fator que está influenciando essa degradação. Outro ponto abordado durante os cultivos foi um alto consumo de ácido para o controle do pH indicando a produção de alguma substância alcalina, que poderia estar ligada a redução na concentração da RF, visto que ela se degrada em meio alcalino, porém esta hipótese foi descartada pois a faixa de pH para ocorrer essa degradação tem que ser superior a um pH de 8. Processo esse que não ocorreu durante os cultivos realizados.

Uma questão também levantada pelo grupo de pesquisa com relação a esse processo de redução da RF, é a possível precipitação da RF durante o processo de produção podendo justificar o fato de observarmos a redução na concentração da RF no final dos cultivos (Ponto de alta concentração em teoria). Esse efeito pode ser observado com a repetição do cultivo realizado em 400 rpm, onde através da alteração da metodologia de coleta da amostra não houve uma redução significativa na produção de RF, como a observada em cultivos anteriores.

Com relação a produtividade mesmo alterando a metodologia de coleta, o 2º cultivo em 400 rpm apesar de apresentar uma produção final de RF maior ele apresentou uma produtividade bastante inferior em comparação ao 1º cultivo em 400 rpm, possivelmente devido ao maior tempo de cultivo sendo de 30h a mais. Com isso concluímos que o cultivo operado em 300 rpm foi o mais favorável para a biossíntese de RF, que apesar de apresentar uma redução na velocidade de crescimento celular em comparação com os cultivos operados a 400 e 800 rpm, atingiu taxas de produção de 2,151 g/L em 48 h com o rendimento $Y_{p/s}$ em média de 0,0242 g/g. Resultados estes bastantes promissores quando comparados a literatura (DEBABOV et al., 1997; LEE et al., 2004b; MAN et al., 2014; WU et al., 2007), mostrando a influência da velocidade de agitação no crescimento e produção.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 321–360, 2011.
- AIZAWA, S.-I. *Bacillus subtilis: The Representative of Gram-Positive Bacteria*. In: AIZAWA, S.-I. **The Flagellar World: Electron Microscopic Images of Bacterial Flagella and Related Surface Structures**. Oxford, London: Academic Press, 2014. chapter 4, p. 22–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00004-9>.
- AVERIANOVA, L. A. et al. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, ID 570828, November, 2020. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.570828>.
- BADINO, A. C.; MENDES, C.; CERRI, M. O. Biorreatores Pneumáticos: Simples e eficientes. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 24-33, 2016. <https://www.researchgate.net/publication/307512660>.
- COSTA JÚNIOR, C. C.; CORREA, L. J. Avaliação de parâmetros de desempenho em reator convencional: aplicação em processos industriais. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 3, p. e3783745, 1 jan. 2019.
- CYTIVA. **What do cells need What do cells need from a bioreactor?**. Gelifesciences. 2020. Folder.
- DEBABOV, V. G. et al. **Strain of Bacterium Bacillus subtilis: A Producer of Riboflavin**. RU2081906C1. 1997.
- DMYTRUK, K. et al. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. **Journal of Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 11–17, 2014.
- DORAN, P. M. Reactor Engineering. **Bioprocess Engineering Principles**, p. 761–852, 2013.
- ESPERANÇA, M. N. **Influência de aspectos geométricos na hidrodinâmica e transferência de oxigênio de biorreatores Airlift de circulação interna**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de ciências exatas e de tecnologia, Universidade federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2014.
- GARCÍA-ANGULO, V. A. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 196–209, 2017.
- GARCIA-OCHOA, F. et al. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview.

Biochemical Engineering Journal, v. 49, n. 3, p. 289–307, 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.

GU, Y. et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 109–121, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.006>.

HÄRTIG, E.; JAHN, D. Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 61, p. 195–216, 2012.

HEMIDA ABD-ALLA, M. et al. Cronicon EC bacteriology and virology research Activation of Riboflavin Production by *Bacillus subtilis* (KU559874) and *Bacillus tequilensis* (KU559876). **EC Bacteriology and Virology Research**, v. 2, p. 131–150, 2016.

HU, J. et al. Mixomics analysis of *Bacillus subtilis*: effect of oxygen availability on riboflavin production. **Microbial Cell Factories**, v. 16, Article number: 150, 12 dez. 2017 <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0764-z>.

JESUINO, A. C. B. M. **Diferentes estratégias de cultivo de Escherichia coli recombinante para produção de proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)**. 2019. Exame de qualificação (Doutorando em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724–725, 2019.

LEE, K. H. et al. **Microorganism for Producing Rboflavin and Method for Producing Riboflavin Using the Same**. In: United States Patent. Patent No.: US 7,078.222 B2, 2004a.

<https://patentimages.storage.googleapis.com/88/43/80/7e564bb5ca4857/US7078222.pdf>.

LEE, K. H. et al. **Microorganisms and Process for the Production of Riboflavin by Fermentation**. In: EUROPEAN PATENT SPECIFICATION. EP 1 426 450 B1. 2004b.

<https://patentimages.storage.googleapis.com/46/10/e7/65ece998e2ad38/EP1426450B1.pdf>.

LIU, S. Bioreactor design and operation. In: LIU, S. **Bioprocess Engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. 3rd. ed. Amsterdam, Netherlands:

Elsevier, 2020. Chapter 18, p. 819–856.

LIU, S. et al. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, Article number: 31, 13 dez. 2020.

LOPES, M. D. **Comparação experimental da troca térmica entre tanque com serpentina helicoidal e com chicana tubular, para impelidor radial e axial**. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Engenharia Mecânica, UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA, Santos, 2013.

https://unisantabr/arquivos/mestrado/mecanica/dissertacoes/dissertacao_marcilio.pdf.

LUO, L. et al. Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with sieve plates. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 12, p. 2377–2388, 2013.

MACK, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; HOHMANN, H.-P. Regulation of Riboflavin Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Is Affected by the Activity of the Flavokinase/Flavin Adenine Dinucleotide Synthetase Encoded by *ribC*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 950–955, 15 fev. 1998.

MAN, Z. WEI et al. Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 661–667, 2014.

MANDENIUS, C.-F. **Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. ISBN: 978-3-527-33768-2.

O'NEIL, MARYADELE J **The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 14th. ed. Hoboken, N.J: Whitehouse Station, 2006.

MESTRE, J. C. et al. Aeration step method for k_La measurement under growth conditions in pneumatic bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 7, p. 2327–2332, 2019.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **Bioreaction Engineering Principles**. 2nd. ed. New York, N.Y.: Springer Science, 2003. ISBN 978-1-4613-5230-3.

ORAEI, M.; RAZAVI, S. H.; KHODAIYAN, F. Optimization of effective minerals on riboflavin production by *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* ATCC 6051 using statistical designs. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 49–55, 2018.

PARK, E. Y. et al. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 91, n. 5, p. 1315–1326, 15 set. 2011.

PAWAR, S. B. Process Engineering Aspects of Vertical Column Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. **ChemBioEng Reviews**, v. 3, n. 3, p. 101–115, 2016.

PEDROLI, D. et al. The ribB FMN riboswitch from Escherichia coli operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. **FEBS Journal**, v. 282, n. 16, p. 3230–3242, 2015a.

PEDROLI, D. B. et al. A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in Bacillus subtilis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. 14054–14059, 10 nov. 2015b.

PERKINS, J. B. et al. Genetic engineering of Bacillus subtilis for the commercial production of riboflavin. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 8–18, 1 jan. 1999.

RIBEIRO, R. M. DE M. G. P. **Efeitos da velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio em biorreator convencional na produção de ácido clavulânico por Streptomyces clavuligerus**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2017.

SABIONI, E. C. S. L. M. **Sistemas de agitação e mistura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Mecatrônica Industrial) - Centro Paula Souza, FATEC Garça, 2013.

SAUER, U. et al. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing Bacillus subtilis. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3687–3696, 1996.

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia Industrial: Volume 2. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blücher Ed. 2001. v. 2, p. 541.

SCHWECHHEIMER, S. K. et al. Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2107–2119, 2016.

SHI, S. et al. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of Bacillus subtilis for riboflavin production. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 4–5, p. 243–252, 2009.

SILVA, D. D. V. et al. Via Fermentativa Parte 2: Aminoácidos e Vitaminas. **Revista Analytica**, v. 19, n. June 2014, p. 62–73, 2005.

SOUZA, A. C. S. DE et al. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887–891, 2005.

STUANI, F. H. **Avaliação da transferência de oxigênio e biorreatores de agitação mecânica e airlift visando à produção de pectinases por *Aspergillus oryzae***. Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Engenharia de Processos e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

SUGIMOTO, T. et al. Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 57–64, 14 jan. 2010.

USUI, N.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMATU, T. Process for Producing Riboflavin by Fermentation. United States Patent. Patent Number: 5,334,510, Aug. 2, 1994. 1997. <https://patentimages.storage.googleapis.com/d7/d4/48/341bdce2b234ed/US5334510.pdf>.

WANG, Q. et al. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. **Process Biochemistry**, v. 70, n. April, p. 36–44, 2018.

WU, Q.-L. et al. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 783–794, 19 set. 2007.

ZAMBONI, N. et al. Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p. 49–55, 2003.

ZHANG, T. et al. Advances in airlift reactors: Modified design and optimization of operation conditions. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 163–182, 2017.

APÊNDICE

Neste anexo são apresentadas as curvas de calibração referentes aos diferentes métodos analíticos descritos no item 4.4.

A1.1 Curva de calibração de Biomassa.

A curva de calibração da densidade óptica versus massa seca para a biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica de suspensões, em duplicata, obtidas por diluição de uma suspensão de células de densidade óptica e de concentração em peso seco conhecidas. A densidade óptica destas suspensões está entre 0,843 e 9,09 unidades de absorbância como mostra a Tabela 11.

Tabela 11: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L).

DO _{600nm}				Massa Seca (g/L)			
Análise		Média		Análise		Média	
0,842	0,812	0,892	0,843	0,3	0,2	0,3	0,267
3,232	3,228	3,164	3,208	1,5	1,4	1,5	1,467
5,24	5,168	5,272	5,227	2,4	2,5	2,6	2,5
6,56	6,56	6,28	6,467	3,5	3,1	3,3	3,3
8,7	9,36	9,22	9,093	4,9	4,8	4,9	4,867

Curva de calibração Biomassa

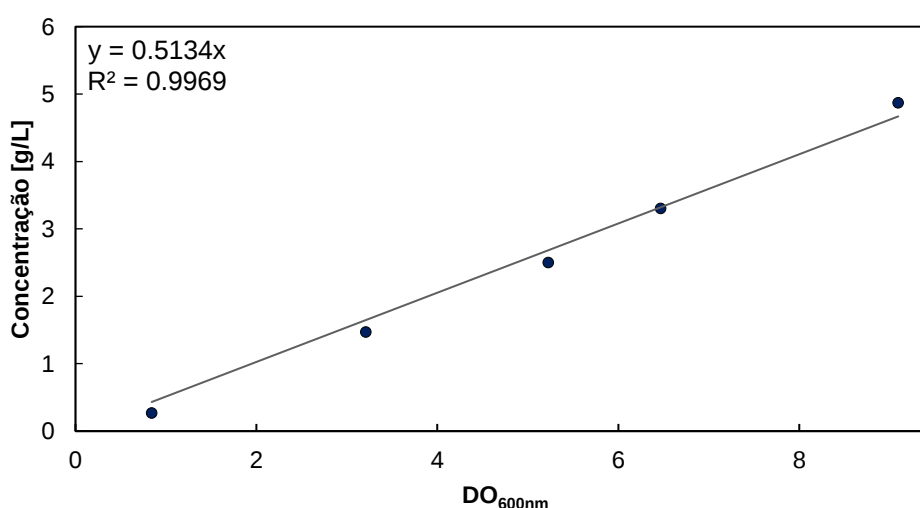


Figura 22: Curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L).

A.1.2 Curva de calibração para conversão de Unidades de Fluorescência (UF) em concentração de RF (mg/L).

A curva de calibração da unidade de fluorescência (UF) versus concentração de RF foi determinada pela leitura da UF em leitor de placas PERKINELMER ENSPIRE®, *Multimode Plate Reader* (Waltham - MA, USA) em comprimento de onda de excitação da molécula de 444 nm e de emissão de fluorescência de 520 nm. Foi utilizado padrão para preparo das soluções de concentração conhecida de RF, compreendidas entre 5 e 22,5 mg/L. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a unidade de fluorescência emitida.

Concentração (mg/L)	Unidade de Fluorescência			
	Análise			Média
5	59265	59801	58729	59265
7,5	83376	71263	79282	77973.67
10	89548	87592	88193	88444.33
15	122238	121872	122605	122238.3
20	142257	142939	142998	142731.33
22,5	156329	151999	153084	153804

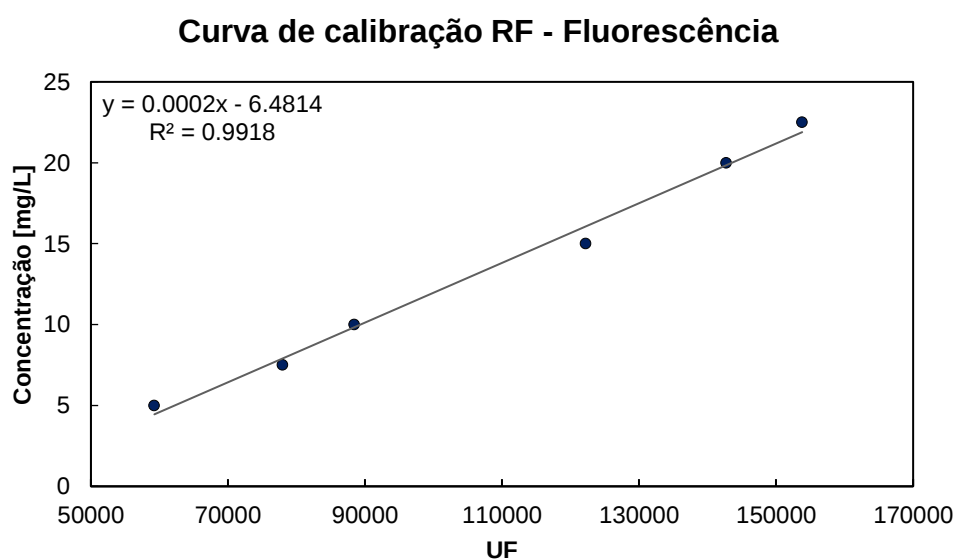


Figura 23: Curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a unidade de fluorescência.

A.1.3 Curva de calibração da concentração de RF versus a área sob a curva foi realizada em HPLC.

As análises foram realizadas através do preparo de 7 soluções de concentrações conhecidas de RF em água, as leituras foram feitas em duplicatas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a área sob a curva.

Concentração (mg/L)	HPLC		
	Área		Média
0,37636	24981	25636	25308,5
1,8818	184243	186121	185182
3,7636	310407	310628	310517,5
9,409	659307	660639	659973
18,818	1203337	1202959	1203148
37,636	2114348	2132863	2123605,5
75,272	4541495	4534561	4538028

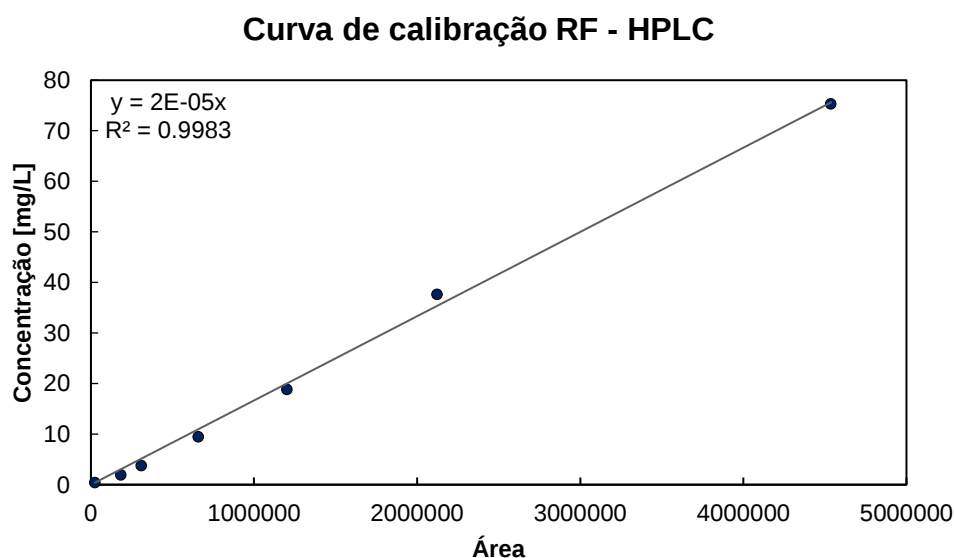


Figura 24: Curva de calibração da concentração de RF (mg/L) versus a área sob a curva.

A.1.4 Curva de calibração da concentração de Sacarose, Glicose e Frutose versus a área sob a curva foi realizada em HPLC.

Através do preparo de 5 soluções de concentrações conhecidas em água. As amostras foram previamente secas, pesadas e diluídas em água em quantidade

suficiente para fornecer as concentrações 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L, 0,8 g/L e 1 g/L. As leituras foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de Sacarose (g/L) versus a área sob a curva.

Concentração (g/L)	HPLC			
	Área			Média
0,2	55778	55482	54483	55247,67
0,4	110973	112086	111809	111622,7
0,6	168777	169496	170060	169444,3
0,8	227077	227327	227848	227417,3
1	286317	286699	287026	286680,7

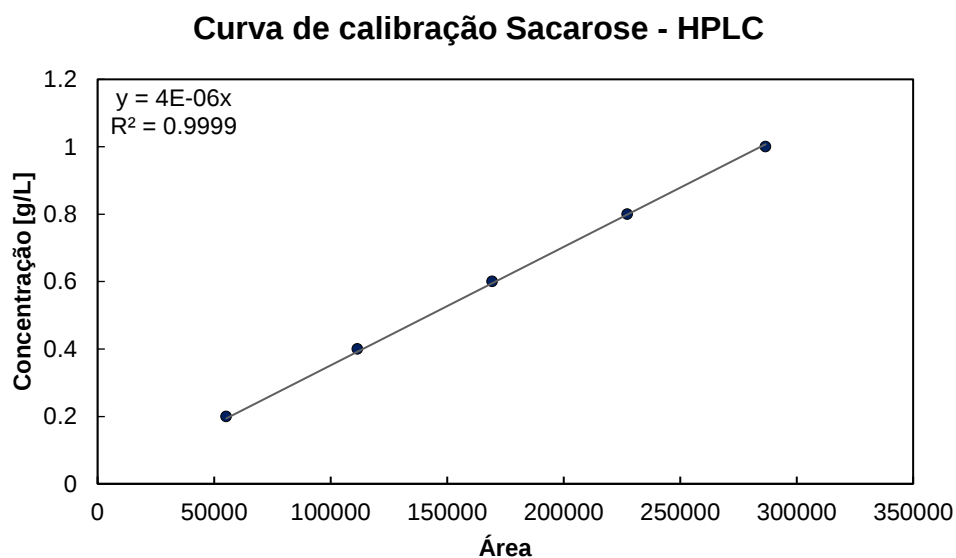


Figura 25: Curva de calibração da concentração de Sacarose (g/L) versus a área sob a curva.

Tabela 15: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de Glicose (g/L) versus a área sob a curva.

Concentração (g/L)	HPLC			
	Área			Média
0,2	54249	54653	54626	54509,33
0,4	110377	110738	111008	110707,7
0,6	167038	167956	168740	167911,3
0,8	224441	224627	225805	224957,7
1	283018	283933	284093	283681,3

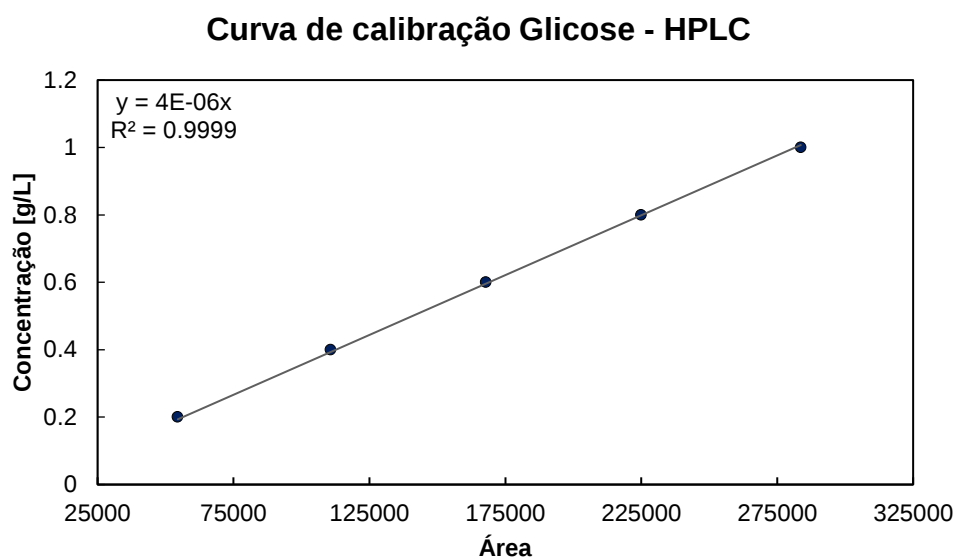


Figura 26: Curva de calibração da concentração de Glicose (g/L) versus a área sob a curva.

Tabela 16: Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de Frutose (g/L) versus a área sob a curva.

Concentração (g/L)	HPLC			
	Área			Média
0,2	40918	41108	40207	40744,33
0,4	72214	72830	74248	73097,33
0,6	115962	117119	118579	117220
0,8	162104	162115	163160	162459,7
1	206958	208567	208772	208099

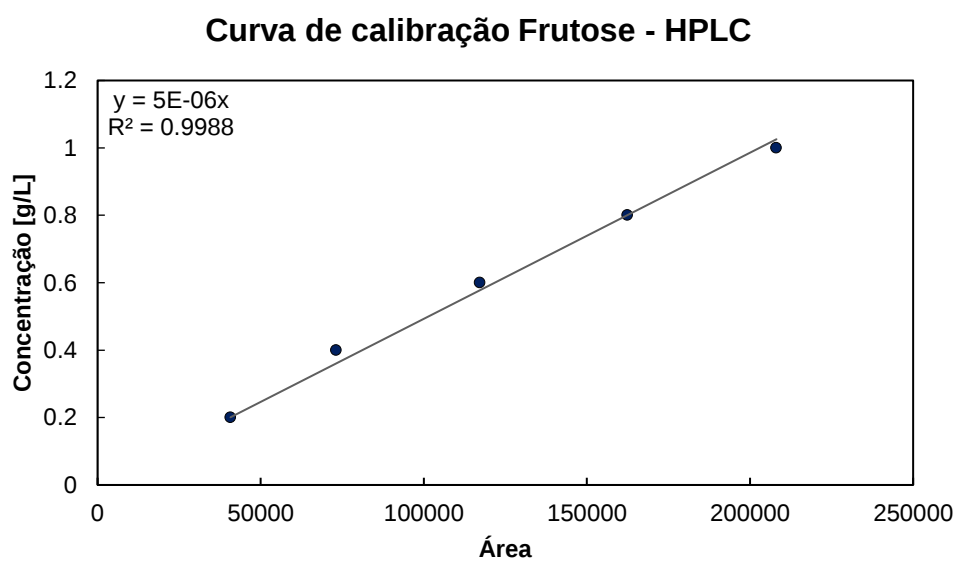


Figura 27: Curva de calibração da concentração de Frutose (g/L) versus a área sob a curva.