

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DE AERAÇÃO E AGITAÇÃO
NA FERMENTAÇÃO COM O
BACILLUS THURINGIENSIS

MARIA HELENA ANDRADE SANTANA
Engenheiro Químico

Orientador: Dra. Iracema de Oliveira Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Ciência em Engenharia de Alimentos.
(Junho - 1980)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais

Aos meus amores:

Cesar, Guilherme e Cíntia

RESUMO

Foi estudada a influência da concentração de oxigênio na produção de inseticida bacteriano por fermentação submersa usando Bacillus thuringiensis.

Os ensaios foram realizados em fermentador descontínuo de 20 litros, usando meio de cultura composto de melaço e água de maceração de milho. A concentração de oxigênio variou de 0,195 a 1,560mg/l (2,5 a 20% da concentração de saturação).

Os resultados experimentais mostraram que a taxa de respiração apresenta um comportamento crescente quando a concentração de oxigênio varia na faixa de 0,195 a 0,780 mg/l, e decrescente entre 0,780 e 1,560 mg/l.

Foi sugerido um modelo matemático para explicar a demanda de oxigênio, na fase logarítmica de crescimento, baseado no decréscimo da atividade enzimática com o excesso de reagente, sendo a taxa de respiração relacionada com os parâmetros cinéticos de crescimento.

Para otimizar as condições operacionais necessárias ao suprimento adequado de oxigênio, foi obtida para esse sistema uma correlação entre taxa de aeração, potência aplicada e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Os resultados experimentais e teóricos mostram que o modelo explica satisfatoriamente o comportamento desse processo.

ABSTRACT

The effect of oxygen concentration on the production of bacterial insecticide by submerged fermentation employing Bacillus thuringiensis is the subject of this present study.

The experimental work was carried out in a 20 liters batch fermentator, using a culture medium composed by sugar cane molasses and corn steep liquor as carbon and nitrogen sources. The oxygen concentration varied from 0,195 to 1,56 mg/l (2,5 to 20% of the saturation).

The experimental results showed that respiration rate increase when oxygen concentration increase from 0,195 mg/l until 0,780 mg/l and decreases thereafter.

A mathematical model was proposed to explain the oxygen demand during the logarithmic growth phase. The model is based on the enzymatic activity decay due the reagent excess. The respiration rate being then correlated with the kinetic parameters of growth.

In order to optimize the operational conditions to adequate supply of oxygen, a correlation between aeration rate, power applied and volumetric coefficient of oxygen transfer was obtained for this sistem.

Theoretical and experimental results show that the model explains satisfactorily the behaviour of this process.

ÍNDICE

	PG
Cap. I - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Apresentação do assunto	01
1.2 - Objetivos	02
Cap. II - REVISÃO BIBLIOGRAFICA	04
2.1 - Produção do inseticidas bacteriano pelo <u>Bacillus thuringiensis</u>	04
2.2 - Aeração e Agitação	05
2.2.1 - Suprimento e demanda de oxigênio	06
2.2.2 - Cinética de oxidação	08
2.2.3 - Efeitos inibitórios do oxigênio	10
2.2.4 - Dispersões gás-líquido em tanques de mistura	11
2.2.5 - Contrôles de aeração	13
Cap. III - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 - Microrganismo	15
3.2 - Meios de cultura	16
3.3 - Equipamentos	16
3.3.1 - Agitador incubador rotativo	16
3.3.2 - Fermentador	17
3.3.3 - Kit de agitação	19
3.3.4 - Equipamentos auxiliares	20

3.4 - Procedimento experimental	21
3.4.1 - Preparo do inóculo	21
3.4.2 - Processo fermentativo	21
3.4.3 - Agitação e Aeração	22
3.5 - Métodos analíticos	23
3.6 - Métodos matemáticos de análise de dados	25
Cap. IV - MODELO MATEMÁTICO	27
Cap. V - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 - Apresentação dos resultados	29
5.2 - Discussão	30
FIGURAS 1 a 16	33 a 47
TABELAS I a V	48 a 53
Cap. VI - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	53
6.1 - Conclusões	53
6.2 - Sugestões	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
NOMENCLATURA	60
ANEXOS I a VII	62 a 73

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 - Apresentação do assunto

O controle microbiano de insetos, vem adquirindo atualmente grande importância, tendo em vista os problemas causados pelos inseticidas químicos, que vão desde a poluição ambiental e desequilíbrio ecológico, até os riscos oferecidos ao homem na sua alimentação, decorrentes de resíduos deixados pelo excesso e inadequação no seu uso.

A velocidade de ação, compatível com a dos inseticidas químicos, a ausência de danos a espécies benéficas sem deixar resíduos, e a possibilidade de associação aos inseticidas químicos, justificam o interesse pela produção comercial de inseticidas bacterianos.

Dentre esses, o inseticida obtido por fermentação com o Bacillus thuringiensis é um dos mais utilizados. Essa bactéria, é um entomopatôgeno, que ao ser cultivada produz várias endo e exo toxinas, das quais a endotoxina (complexo cristal-esporo tóxico) é efetiva no controle de cerca de 150 espécies de Lepdoptera. Estas, na fase jovem se apresentam como lagartas, fitófagas em sua absoluta maioria, causando enormes prejuízos à Agricultura (Olericultura e Silvicultura) tanto em vegetais folhosos quanto em produtos armazenados (grãos, frutas, doces secos, etc...).

Os Estados Unidos e alguns países europeus, produzem-no comercialmente com bons resultados. No Brasil, ainda em fase de estudos, foi realizada uma pesquisa de substratos economicamente viáveis e em disponibilidade durante todo o ano.

Visando ainda estabelecer as condições de projeto de fermentadores para esse sistema, essa linha de pesquisa teve continuidade, com o estudo do comportamento dessa fermentação com os substratos já analisados quanto ao crescimento celular, esporulação e consumo de açúcares. No mesmo estudo, foi evidenciado o elevado consumo de oxigênio durante a fermentação, e a necessidade de pesquisa no sentido de verificação da influência da concentração de oxigênio sobre o rendimento celular. Outro aspecto importante refere-se às condições operacionais relacionadas com a transferência de massa no sistema, uma vez que, num processo industrial, para obter elevada concentração celular, o suprimento adequado de oxigênio torna-se um problema crítico, onde os custos de aeração devem ser considerados.

1.2 - Objetivos

Numa tentativa de caracterizar o referido processo fermentativo quanto à demanda biológica e suprimento de oxigênio ao meio, fixamos para o nosso trabalho os seguintes objetivos:

1. Proposição de um modelo cinético de crescimento com o oxigênio como substrato limitante do processo.

2. Estabelecimento de uma correlação empírica entre as principais variáveis operacionais e coeficiente volumétrico de transferência de massa, visando o projeto e operação de um fermentador industrial.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Produção de inseticidas bacterianos pelo Bacillus thuringiensis

O inseticida bacteriano produzido por fermentação com o Bacillus thuringiensis é um dos mais largamente usados (1,2).

Os primeiros estudos no sentido de produção desse inseticida, sugeriram vários meios de cultura, tendo sido mostrada a dependência entre a atividade tóxica do inseticida, meio de cultura e linhagem empregada (3,4,5,6,7). Vários outros trabalhos referem-se à recuperação do produto, complexo esporo-cristal, e à sua normalização, que ao contrário dos inseticidas químicos, é difícil de ser controlada (8,9,10,11). Métodos de contagem de cristais e esporos são apenas presuntivos, tendo em vista que o método de produção pode modificar a atividade dos componentes tóxicos. A aplicação de bioensaios, embora apresente dificuldades, é conclusiva na determinação da atividade tóxica do produto. Uma extensa apresentação destes trabalhos encontra-se em (12,13), nos capítulos referentes à revisão bibliográfica.

Nos trabalhos de Moraes, (12,13), foram estudados em escala laboratorial e piloto a produção de um inseticida bacteriano utilizando Bacillus thuringiensis NCIB 9207, e subprodutos

industriais como matéria prima. Melaço e água de maceração de milho mostraram-se excelentes substratos, tendo sido demonstrado através de bioteste, a eficiência do inseticida obtido em Asciamonuste orseis (Lepdoptera - Pieridae).

Moraes, Hokka e colab. (14), visando estabelecer condições de projeto, propuseram um modelo cinético de crescimento e esporulação, com os açúcares como substrato limitante do processo. Os nutrientes usados foram melaço e água de maceração de milho, e as fermentações foram realizadas em escala semi-piloto. O crescimento seguiu basicamente a cinética de Monod, enquanto que a esporulação foi suposta ser controlada por um "effector" formado a baixas concentrações da fonte de carbono. A demanda biológica de oxigênio foi determinada durante a fermentação, e propostos perfis do coeficiente volumétrico de transferência de massa e variáveis operacionais, correlacionados empiricamente.

2.2 - Agitação e Aeração

As propriedades da transferência de oxigênio das bolhas de ar para o microrganismo, não apresentam simplesmente natureza física. Grandes distorções são encontradas entre os valores da demanda biológica calculados considerando somente a natureza física do processo de transferência de massa, e aqueles determinados experimentalmente. Uma comparação entre esses valores é apresentada em Aiba (15). Num processo fermentativo, para que o suprimento e demanda biológica de oxigênio sejam rea-

lizados de maneira adequada, as propriedades relativas à aeração e agitação do sistema devem ser previstas considerando dois aspectos:

1. A transferência física do oxigênio das bolhas de ar para o líquido;
2. A provisão de oxigênio para a demanda enzimática por parte dos microrganismos.

2.2.1- Suprimento e demanda de oxigênio

O processo global de suprimento de oxigênio ao meio de fermentação é composto dos seguintes processos parciais: transferência de massa na fase gasosa, dissolução na interface gás-líquido, e transferência de massa na fase líquida. A alta velocidade do primeiro desses processos em relação aos outros, faz com que a transferência de massa na fase gasosa não seja considerada. Por outro lado, a turbulência criada pela agitação mecânica, proporciona um considerável decréscimo na taxa de transferência de massa do segundo processo em relação ao terceiro, de modo que, a dissolução das bolhas de ar é considerada como etapa determinante do processo global de transferência de massa, reforçada pelos efeitos de superfície, ainda pouco entendidos, causados pela adição de anti-espumantes ao meio.

Assim, a variação da concentração de oxigênio dissolvido no meio e as taxas dos processos citados são correlacionados pela equação:

$$\frac{dC_l}{dt} = (K_L a)_{G-L} (C^* - C_l) = 2 Y_S \frac{\pi n D^2 D_k}{V} (C_l - C_m) = RX \quad (2.1)$$

onde as taxas de suprimento de oxigênio da interface gás-líquido para o seio da solução e dessa para a superfície da célula, são iguais à taxa de respiração.

A comparação entre os coeficientes de transferência de massa e cinéticos, determina o grau de influência dessas etapas parciais na taxa global do processo, e é de grande importância para a realização segura do projeto desses sistemas. Elsworth (16), em experiências com Aerobacter cloacae, verificou que a taxa de crescimento no início de fermentação era exponencial, não implicando em limitação por parte do oxigênio e outros substratos. Posteriormente, com uma concentração de células em torno de 3 mg/l, a taxa de crescimento tornava-se constante sugerindo a transferência de massa como etapa controladora do processo. Nessa situação, $C_l \ll C^*$ e

$$\frac{dC_l}{dt} = (K_L a)_{G-L} C^* \quad (2.2)$$

onde C_l é a concentração de oxigênio no líquido, $(K_L a)_{G-L}$ o coeficiente volumétrico de transferência de massa na interface gás-líquido, t o tempo, e C^* é a solubilidade do oxigênio na solução, representando a concentração de oxigênio dissolvido na interface gás-líquido em equilíbrio com ar a uma determinada pressão parcial de oxigênio.

Calderbank (17), explica este comportamento, considerando que o acelerado crescimento das células aumenta rapidamente a área interfacial célula-líquido, de modo que o coeficiente $(K_L a)_{L-M}$ sofre considerável acréscimo, igualando-se ao termo $2 \pi DDL$ da equação (2.1), e nessa situação a diferença de concentrações $(C_L - C_m)$ é muito pequena, e $C \ll C^*$. Na ausência de micélio, $C_L \approx C_m$, não ocorrendo limitação no estágio de difusão do oxigênio do seio da solução para a superfície das células.

Van de Vusse (18), mostrou que em estado estacionário é válida a seguinte equação:

$$RX = K_L a C^* \frac{K'}{K' + K_L a} \quad (2.4)$$

onde: $K' = \frac{R_m X}{K_o}$

Para $K_L a \ll K'$, a etapa controladora do processo é a transferência de massa, e para $K_L a \gg K'$, a cinética de oxidação. Para o primeiro caso, $C_L \rightarrow 0$ e $RX = K_L a C^*$, enquanto que para o segundo $C_L \rightarrow C^*$ e $RX = K' C_L$. Num caso intermediário, ambos os processos contribuem, e a equação (2.4) é usada totalmente.

2.2.2- Cinética de oxidação

Em geral, a cinética de oxidação em culturas aeróbicas, segue um modelo semelhante ao de Michaelis-Menten, no qual a relação entre a taxa específica de crescimento e concentração

de oxigênio dissolvido, quando esse é o substrato limitante do processo, é da forma:

$$R = \frac{R_m C_l}{K_s + C_l} \quad (2.5)$$

Para baixas concentrações de oxigênio tem-se aproximadamente uma cinética de primeira ordem, até um valor crítico dessa concentração, quando a taxa de respiração é máxima como mostrada na Fig. 1. O comportamento além da concentração crítica, ainda pouco definido, indica uma inclinação negativa na curva, cujo decréscimo da taxa de respiração é atribuída a efeitos inibitórios na sequência de reações enzimáticas. Estudos nesse sentido serão revistos no parágrafo 2.2.3.

A relação entre as taxas específicas de crescimento e respiração é linear, e a intersecção com a origem representa a taxa de respiração para manutenção celular.

Hospodka (19), considerando desprezível a respiração endógena para culturas com elevada taxa de crescimento, propôs a relação:

$$\mu = Y_s R \quad (2.6)$$

onde a constante de proporcionalidade pode ser interpretada como a constante de rendimento celular com relação ao oxigênio, semelhante à proposta por Monod para a utilização da fonte de carbono.

Valores de concentrações críticas de oxigênio, bem como

de máximas taxas de respiração foram determinados para vários microrganismos e uma relação desses valores e respectivas referências bibliográficas são citadas por Brown (20).

2.2.3- Efeitos inibitórios do oxigênio

Os efeitos inibitórios do oxigênio têm sido estudados no sentido de localização dessa ação nos componentes celulares.

Em geral, esses efeitos manifestam-se a elevadas pressões. Chance et al (21) expôs tecidos animais a elevadas pressões de oxigênio observando que nessas condições ocorreu uma oxidação da maioria do NAD celular.

Esse efeito foi então considerado como uma inibição do transporte de eletrons do succinato para o NAD, por parte do oxigênio.

Barthley e Broomhead (22), verificaram os efeitos inibitórios do oxigênio a concentração de 40%, no crescimento de Saccharomyces cerevisiae em meio cuja concentração de íons potássio era limitante. Concentrações de 100% de oxigênio e 3 mM de íons potássio no meio foi suficiente para produzir um crescimento normal da cultura.

Begin et al (23), em estudos com Artaria longa, observaram sua sensibilidade ao oxigênio a pressão atmosférica. As células foram tratadas com 95% de oxigênio, resultando num decréscimo de 50% no crescimento. Os efeitos sobre a respiração foram dependentes do tempo de exposição, e provavelmente à le-

são mitocondrial, tendo em vista o decréscimo de 75% na atividade de succinato oxidase, bem como outros efeitos na mitocôndria isolada dessas células. O retorno às taxas normais de crescimento e respiração foram verificadas tão logo as células foram expostas à atmosfera de ar e dióxido de carbono.

2.2.4- Dispersões gás-líquido em tanques de mistura

Pelo descrito no parágrafo 2.2.1, a transferência na interface gás-líquido é a etapa controladora do processo global. Assim, o problema da transferência de oxigênio das bolhas de ar para o meio de fermentação resume-se na geração de dispersões gás-líquido de alta área interfacial, e na previsão da influência das principais variáveis operacionais sobre o seu coeficiente de transferência de massa.

Os processos fermentativos geralmente empregam baixa taxa de aeração e agitação mecânica para maior contato entre as fases. Diâmetro e área interfacial das bolhas determinam as taxas de transferência de massa entre as fases componentes da dispersão, sendo ambas relacionadas através da fração em volume da fase dispersa, pela equação:

$$a = \frac{6 \cdot U}{D} \quad (2.7)$$

Nos trabalhos de Calderbank (24), são revistas e desenvolvidas uma série de técnicas de medidas dessas variáveis, e propostas correlações envolvendo parâmetros físicos e opera-

cionais.

Figueiredo (25), utilizando vários tipos de agitadores em sistema ar-água mediu as citadas variáveis a diferentes níveis de agitação e aeração. As várias técnicas de medidas foram comparadas, bem como a eficiência dos agitadores, tendo sido correlacionadas estas variáveis com potência aplicada por unidade de volume e velocidade de aeração.

Em meios de fermentação, as propriedades das dispersões dinamicamente mantidas, são expressas em termos de $K_L a$, coeficiente volumétrico de transferência de massa, que caracteriza a capacidade de transferência de oxigênio no sistema.

As primeiras medidas deste coeficiente foram feitas por Cooper et al (26), em tanque agitado, utilizando o método de oxidação do sulfito como teste para avaliação da eficiência de contactores gás-líquido.

Mais tarde, Bartholomeu e Karow (27), usaram o mesmo método na presença de células vivas. Outras medidas envolvendo células, através de leituras polarográficas foram feitas por Hixon e Gaden (28), por amostragem com seringa hipodérmica contendo fenol para matar as células.

Métodos dinâmicos foram desenvolvidos por Taguchi e Humphrey (29), envolvendo deaeração e aeração do sistema, e registro da curva de concentrações de oxigênio durante a fase de aeração.

Tuffile e Pinho (30), apresenta uma comparação entre os

vários métodos de determinação do $K_L a$ em fermentadores, selecionando o método do balanço material de oxigênio para meios altamente viscosos como na fermentação com Streptomyces.

Calderbank (31), na ausência de células, usou método de absorção de gases.

Figueiredo (25), determinou o $K_L a$ através de amostragens e registros polarográficos, em estado não estacionário tendo feito uma comparação entre os valores obtidos para vários tipos de agitadores, e utilizando diferentes modelos de análise de dados.

A maioria dos dados publicados sobre $K_L a$ tem sido correlacionados por expressões da forma:

$$K_L a = K (P/V)^\alpha (V_g)^\beta \quad (2.8)$$

a qual é semelhante às correlações propostas para área interfacial e fração volumétrica de retenção. Os expoentes propostos variam consideravelmente, estando o expoente de P/V geralmente na faixa de 0,35 a 0,95, enquanto que o de V_g varia entre 0 e 1. Essas variações, são fundamentalmente atribuídas à geometria do sistema, gama de variáveis envolvidas, complexa hidrodinâmica do sistema e prováveis erros nas técnicas de medição.

2.2.5- Contrôle de aeração

O controle de aeração em sistemas de fermentação aeróbia

cos torna-se muito importante uma vez que não só permite o máximo aproveitamento da capacidade de aeração do sistema, bem como previne o suprimento inadequado de oxigênio ao microrganismo, permitindo a operação nas condições ótimas de produtividade.

Vários são os processos de controle de aeração, sendo em todos eles controlada a concentração de oxigênio dissolvido no meio, e tendo como base comum o ajuste da taxa de absorção de oxigênio à demanda biológica da cultura.

A concentração de oxigênio dissolvido no meio pode ser controlada pela quantidade de aeração, velocidade de agitação ou por variação na pressão do oxigênio no ar de entrada do fermentador por adição de oxigênio puro.

Hospodka (19) verificou que esses métodos dão bons resultados quando realizados em laboratório, embora apresentem dificuldades em escala industrial. Nesse mesmo trabalho Hospodka desenvolveu um tipo de controle de aeração através do controle da alimentação de nutrientes ao meio. O princípio básico considerado, foi o equilíbrio entre as taxas de absorção de oxigênio, OAR, e demanda biológica, mantido através da concentração de oxigênio dissolvido no meio COD. Soluções gráficas foram sugeridas para o controle de parâmetros do sistema, utilizando relações entre COD, demanda biológica, taxa específica de crescimento, concentração de microrganismos. Quando a concentração de oxigênio dissolvido aumenta a um determinado

valor C_{x_1} , a válvula controladora da alimentação de nutrientes é aberta. A taxa de respiração \bar{R} , é aumentada e a concentração de oxigênio dissolvido retorna ao seu valor inicial.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Microorganismo

Foi utilizado o Bacillus thuringiensis NCIB 9207, mantido em tubos estoque em meio agar nutriente.

3.2 - Meios de cultura

Para ambas, fermentação e pré-fermentação, foi usado o mesmo meio de cultura líquido, com a seguinte composição:

Melaço - 15g/l

Água de maceração de milho 40g/l

pH : 7,3

O meio de cultura foi aquecido a 100°C para a precipitação de sólidos, e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. Para a pré-fermentação, foi colocado em frascos erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um 50 ml de meio líquido, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O meio de fermentação foi esterilizado juntamente com o fermentador, por circulação de vapor saturado na camisa do vaso de fermentação à pressão de 1,5kg/cm² por 30 minutos.

3.3 - Equipamentos

3.3.1 - Agitador-Incubador rotativo

Para as pré-fermentações foi utilizado agitador-incubador rotativo, Psycrotherm da New Bruswik Scientific C.O., INC, modelo G-27, com as seguintes características:

Velocidade 40 a 400 rpm (± 5)

Temperatura 0 a 60°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)

Passo: 2,54cm

3.3.2 - Fermentador

Foi utilizado uma unidade de fermentação CHEMAP, modelo F-0020, dotado de painel de controle de agitação, aeração, pH e temperatura, e com as seguintes características:

a) Tanque de fermentação: Tanque cilíndrico de aço inoxidável de 20 litros de capacidade, operado com volume útil de 11 litros, possuindo 4 aletas, e as seguintes características geométricas que estão apresentadas em detalhe nos anexos I e II.

$$T = 0,240\text{m}$$

$$D/T = 0,322 ; H_T/T = 2,03 ; H_L/T = 1,0$$

$$H_1/T = 0,288 ; H_2/T = 0,625 ; H_A/T = 0,083$$

$$W_b/T = 0,0825 ; L/D = 0,242 ; W/D = 0,309$$

b) Sistema de asração: Constituído de anel dispersor com 15 orifícios de 1,4mm de diâmetro e filtros de porcelana porosa para esterilização do ar na entrada e saída do equipamento. A vazão de ar foi medida por

rotâmetro BROOKS tipo 1355-10A-1BAB. Foi utilizado a nalizador de oxigênio dissolvido Beckman, modelo 777 tipo polarográfico acoplado com registrador, para a medida da concentração de oxigênio no meio, e analizador de oxigênio Hidrocean, modelo ELPAN-S/01 para a determinação da concentração de oxigênio no ar de saída do fermentador.

- c) Sistema de agitação: Constituído por duas turbinas de disco, de seis pás, acionado por motor de corrente contínua com controle eletrônico de velocidade na faixa de 100 a 1000 rpm.
- d) Sistema de controle de temperatura: Tem como elemento sensor um termômetro de resistência de platina; o sistema de controle; HARTMANN-BRAUN, opera por realimentação, atuando sobre a admissão alternada de água de refrigeração e água aquecida por reostatos de imersão na camisa do tanque.
- e) Sistema de controle pH: Tem como elemento sensor um eletrodo de pH, combinado INGOLD, esterilizável, cuja leitura é amplificada por um amplificador de tensão METRHOM HERISAU modelo E 450, acoplado a um controlador eletrônico de pulso METRHOM HERISAU modelo E-470. O controlador opera uma bomba peristáltica HILOFLOW, da METERING PUMPS Ltd., de vazão ajustável.

3.3.3 - Kit de agitação

Para os experimentos de agitação e aeração, foi utilizada do Kit de agitação BENC0, modelo ELB da Bench Scale Equipment Co, USA com as seguintes características:

- a) Tanque de mistura: Tanque cilíndrico de vidro Pirex, de 20% de capacidade, operado com volume útil de 11 litros, possuindo 4 aletas e as seguintes características geométricas que estão apresentadas em detalhe nos anexos III e IV.

$$T = 0,0745m$$

$$W/D = 0,125 ; D/T = 0,0423$$

$$L/T = 0,918 ; W_b/T = 0,0521$$

- b) Sistema de agitação: Constituído por uma turbina de disco de 6 pás, de aço inoxidável, com diâmetro de 0,1016 m colocada a uma distância de $1/6T$ acima da base do tanque. Um esquema desse tipo de turbina é mostrado no anexo I. A velocidade de agitação na faixa de 0 a 1100 rpm, é controlada através de micrometro que possui uma relação linear entre a velocidade produzida e a graduação do disco.

- c) Sistema de aeração: Constituído de anel dispersor de ar com 16 orifícios de 1,4mm de diâmetro, colocado a uma distância de $\frac{1}{12} T$ abaixo do agitador. A vazão de ar foi medida por rotâmetro calibrado em l/min.

A concentração de oxigênio dissolvido no líquido foi medida por analisador de oxigênio Beekman, modelo 777 tipo polarográfico acoplado com registrador.

- d) Sistema de medida do torque: Constituído de um braço metálico de 12,5cm de comprimento, acoplado a um dinamômetro. Com a leitura da força produzida pela rotação do agitador e o comprimento do braço obtém-se o torque. Um esquema desse sistema é mostrado no anexo V .

3.3.4 - Equipamentos Auxiliares

- Espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch and Lomb.
- Balanças de precisão Mettler:
 - P 160 N (max. 160g, div. 1 mg)
 - P 1000 N (max. 1000g, div. 1g)
- Autoclave Wisconsin Aluminium Foundry C.O., Inc. modelo Steroclave nº 25.
- Centrífuga Excelsa da Fanem (0 - 5000 rpm) modelo 204 N
- Estufa para secagem Fanem graduada a temperatura ambiente a 60°C, com sistema de convecção de ar forçado no sentido horizontal.

3.4 - Procedimento experimental

3.4.1 - Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram feitas duas pré-fermentações em frascos erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um deles 50 ml de meio líquido previamente esterilizados.

Após resfriamento, a primeira pré-fermentação foi inoculada com uma alça de microrganismos, retirados dos tubos estoques e levados a agitador rotatório com temperatura controlada em 30°C e agitação de 200 rpm por 8 horas. Os frascos da segunda pré-fermentação foram inoculados com o meio da primeira pré-fermentação na proporção de 10% (V/V), e levados a agitador rotatório nas mesmas condições anteriores, por 12 horas.

3.4.2 - Processo fermentativo

O fermentador foi usado com um volume útil de 11 litros, dos quais 10 litros eram de meio de cultura e 1 litro de inóculo.

As fermentações foram realizadas à temperatura de 30°C ± 2°C, com duração de 5,5 horas, tempo necessário para o microrganismo atingir a fase estacionária de crescimento. O pH inicial foi de 7,3, sendo controlado após o decréscimo em 6,5. O ar suprido ao fermentador teve a sua vazão controlada em 5,5 l/min durante toda a fermentação.

Devido a elevado consumo de oxigênio na fase logarítmica de crescimento, e para que a etapa de transferência física

não se tornasse o fator limitante do processo, as fermentações procederam-se a uma concentração de oxigênio constante, controlada numa determinada percentagem do valor de saturação. O controle foi feito manipulando o K_L através da velocidade de agitação, e registro contínuo da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Os experimentos foram realizados na faixa de concentrações de oxigênio de 0,195 a 1,55 mg/l (2,5 a 20% da concentração de saturação).

As amostras para a determinação da concentração celular e de açúcares redutores foram retiradas em intervalos de 30 minutos, ao mesmo tempo em que se efetuaram leituras da concentração de oxigênio no ar de saída do fermentador para a determinação da taxa de respiração.

3.4.3 - Agitação e Aeração

Os experimentos de agitação e aeração foram feitos utilizando o meio de cultura após 5,5 horas de fermentação, em Kit de agitação, com temperatura controlada em 30°C e a diferentes velocidades de agitação e aeração.

A velocidade de agitação variou entre 672,5 a 845 rpm, e a velocidade de aeração entre 5,758 a 13,515 m/h.

Para cada condição, foi determinado o torque produzido pela rotação do agitador, e registrada a concentração de oxigênio dissolvido.

3.5 - Métodos Analíticos

Os açúcares redutores expressos em glicose, foram analisados por modificação do método original de Morris (32), usando o reagente anthrone.

A concentração celular, X , foi determinada por pesagem da massa seca à 105°C após centrifugação, e o seu acompanhamento durante a fermentação foi feito através de medidas da densidade ótica em amostras centrifugadas e re-suspensas em água destilada.

A taxa específica de crescimento, μ' , foi determinada pelo modelo de Monod, no qual

$$\frac{dX}{dt} = \mu'X \quad (3.1)$$

Integrando a equação (3.1) nos limites X_0 e X , e 0 e t obtém-se:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu't \quad (3.2)$$

A taxa de respiração foi determinada através de um balanço de oxigênio em todo o fermentador, com as seguintes considerações:

- A concentração volumétrica de oxigênio no ar de entrada do fermentador é de 21%.
- A concentração de oxigênio dissolvido em água destilada a 30°C em equilíbrio com ar de cuja concentração

de oxigênio é 21% é de 7,8 ppm.

- O estabelecimento de regime estacionário durante pequenos intervalos de tempo, para os quais a concentração celular permanece aproximadamente constante.

Resultando a seguinte equação:

$$RX = \frac{F}{V} \frac{0,21}{7,8} (7,8 - L_s) \quad (3.3)$$

onde L_s é a leitura da concentração de oxigênio dissolvido em água destilada em equilíbrio com o ar de saída do fermentador.

O $K_L a$ foi determinado em presença de microrganismos, por método dinâmico desenvolvido por Taguchi (30).

Uma curva característica desse método é apresentado no anexo VII.

A equação (2.1) foi resolvida admitindo que:

- As etapas de transferência de oxigênio na interface gás-líquido e a demanda biológica determinam o processo global de aeração do sistema, resultando a expressão:

$$\frac{dC_l}{dt} = K_L a (C^* - C_l) - RX \quad (3.4)$$

- Para determinadas condições de agitação e aeração é atingido um estado de equilíbrio no qual a concentração

de oxigênio dissolvido no meio, C_{∞} , permanece constante, e a força motriz de transferência de massa torna-se igual a $(C^* - C_{\infty})$. Nessas condições tem-se:

$$RX = K_l a (C^* - C_{\infty}) \quad (3.5)$$

Substituindo a equação (3.5) na equação (3.4) obtém-se:

$$\frac{dC_l}{dt} = K_l a (C_{\infty} - C_l) \quad (3.6)$$

Integrando essa expressão desde o instante inicial (instante em que começa a aeração) até um instante t qualquer, tem-se:

$$\ln \frac{C_{\infty} - C_l}{C_{\infty} - C_0} = K_l a t \quad (3.7)$$

onde C_0 é a concentração média de oxigênio dissolvido para $t=0$.

A potência aplicada ao agitador foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{POTÊNCIA (HP)} = \frac{(\text{TORQUE lbf-in}) (\text{RPM})}{63.000} \quad (3.8)$$

3.6 - Métodos matemáticos de análise de dados

Aos dados de taxa de respiração, R , versus tempo, obtidos durante as fermentações, foi ajustado um polinômio de segundo grau pelo método dos mínimos quadrados e determinado analiti-

camente o valor máximo da taxa de respiração, R' , correspondente a uma determinada concentração de oxigênio no meio.

Para as mesmas condições, foi determinada a taxa específica de crescimento, μ' , ajustando uma relação linear pelo método dos mínimos quadrados, as variáveis da equação (3.2). O mesmo método foi usado na obtenção da equação de regressão entre R' e μ' .

Para o cálculo das constantes cinéticas, a equação (4.5) foi modificada de modo a se obter uma expressão de segundo grau em C_s , ajustando-se pelo método dos mínimos quadrados um polinômio de segundo grau aos dados de C_s/R versus C_s .

As constantes da correlação entre $K_L a$ e variáveis operacionais foram determinadas por regressão linear (método dos mínimos quadrados com múltiplas variáveis).

CAPÍTULO IV

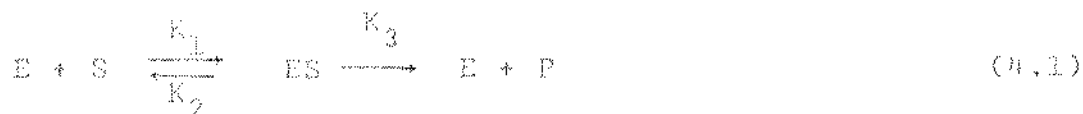
MODELO MATEMÁTICO

O modelo matemático de crescimento considerando o oxigênio como substrato limitante do processo, seguiu basicamente uma cinética enzimática de Michaelis-Menten com inibição por excesso de substrato.

O modelo foi elaborado considerando que:

- a) A formação de produto, inseticida bacteriano, está intimamente ligada à formação de células, P , na fase logarítmica de crescimento.
- b) O crescimento celular é controlado pela formação de um complexo enzima-oxigênio, $E-S$, que se decompõe formando células e regenerando a enzima.
- c) O oxigênio, S , quando em excesso, age como inibidor, reagindo com parte do complexo $E-S$, resultando num decréscimo da atividade enzimática, com conseqüente diminuição na formação de células.

As equações cinéticas para o modelo são as seguintes:



Admitiu-se que essas reações realizam-se dentro da célula, e as taxas de variação de concentração podem ser expressas como:

$$\frac{dC_E}{dt} = K_1 C_E C_S - K_2 C_{ES} \quad (4.3)$$

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = K_4 C_{ES} C_S - K_5 C_{ES}^2 \quad (4.4)$$

A taxa de reação $K_3 C_{EO}$ foi expressa em função da taxa de respiração R' (mmolO_2/hg), sendo a taxa $K_3 C_{ES}$ a máxima velocidade de crescimento celular para uma determinada concentração de oxigênio, resultando a seguinte equação:

$$R' = \frac{R'_M C_S}{K'_S + C_S + C_S^2/K''_S} \quad (4.5)$$

Para a previsão das condições operacionais de suprimento de oxigênio ao meio, foi proposto uma correlação empírica entre o coeficiente volumétrico de transferência de massa, potência por unidade de volume e velocidade superficial do ar, da forma apresentada pela equação (2.7) no parágrafo 2.2.4, ou seja:

$$K_L a = K (P/V)^\alpha (v_S)^\beta \quad (2.7)$$

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Apresentação dos resultados

O consumo de oxigênio foi expresso em termos de taxa de respiração R (quantidade de oxigênio consumido por unidade de tempo e massa celular).

As figuras 2 a 13 mostram o comportamento característico das fermentações cujas concentrações de oxigênio no meio foram mantidas em 0,195; 0,312; 0,484; 0,780; 0,936; 1,365; 1,56 mg/l.

Nas mesmas figuras são apresentadas as equações dos polinômios obtidos, com os respectivos coeficientes de correlação, r , e o erro médio relativo entre pontos teóricos e experimentais.

Na tabela I são apresentados os valores de médios de R' e μ' para os correspondentes valores de C_s , e a relação linear obtida entre R' e μ' é mostrada na figura 14.

O polinômio ajustado para o cálculo das constantes cinéticas do modelo proposto apresentou coeficiente de correlação de 0,999, e erro médio relativo entre pontos teóricos e experimentais de 4,05%.

Na tabela II são apresentados os valores obtidos para as constantes cinéticas do modelo.

Na figura 15 tem-se a comparação entre os valores de R' experimentais e teóricos calculados pela equação (4.5).

Na tabela IV são apresentados os valores de $\ln \frac{C_{\infty} - C_0}{C_{\infty} - C}$ utilizados na equação para o cálculo do $K_L a$. Esses valores foram obtidos de curvas semelhantes a do anexo VI, para as diferentes condições de agitação e aeração.

Na tabela V são apresentados os dados de $K_L a$ potência, velocidades de agitação e aeração obtidos no Kit de agitação.

Na tabela III são apresentadas as constantes obtidas para a correlação empírica entre a $K_L a$, P/V e V_S , bem como o seu coeficiente de correlação $r_{1,2,3}$.

Um exemplo da utilização dessa correlação é proposto na figura 16, através de um perfil de agitação e aeração, necessário à variação adequada do $K_L a$ durante uma fermentação a uma concentração de oxigênio dissolvido mantido em 10% da concentração de saturação.

5.2 - Discussão

O comportamento apresentado pela taxa de respiração em função da concentração de oxigênio dissolvido é típico de inibição por excesso de substrato, o que sugere um possível decréscimo na atividade enzimática, tal como evidenciado em (23)

com Astásia Longa.

A taxa de respiração apresentou valores máximos de 13,04 mmol/hg para concentrações de oxigênio na faixa de 7 a 10% do valor de saturação. Concentrações fora dessa faixa acarretam queda na taxa de respiração, obtendo-se um decréscimo a valores de 8,88 mmol/hg.

A taxa máxima de formação de células foi de $0,62h^{-1}$, variando até 0,48 para concentrações de oxigênio abaixo de 10%.

Desse modo, fermentações controladas na faixa de máxima produtividade, com uma previsão das condições de trabalho, possibilitam utilizar a máxima capacidade de aeração do sistema e evitando perdas de energia.

O controle dessas fermentações tanto pode ser feito através da velocidade de agitação, tal como apresentado na figura 16, como manipulando a pressão parcial de oxigênio no ar de alimentação, ou por adição de substrato tal como proposto em (19).

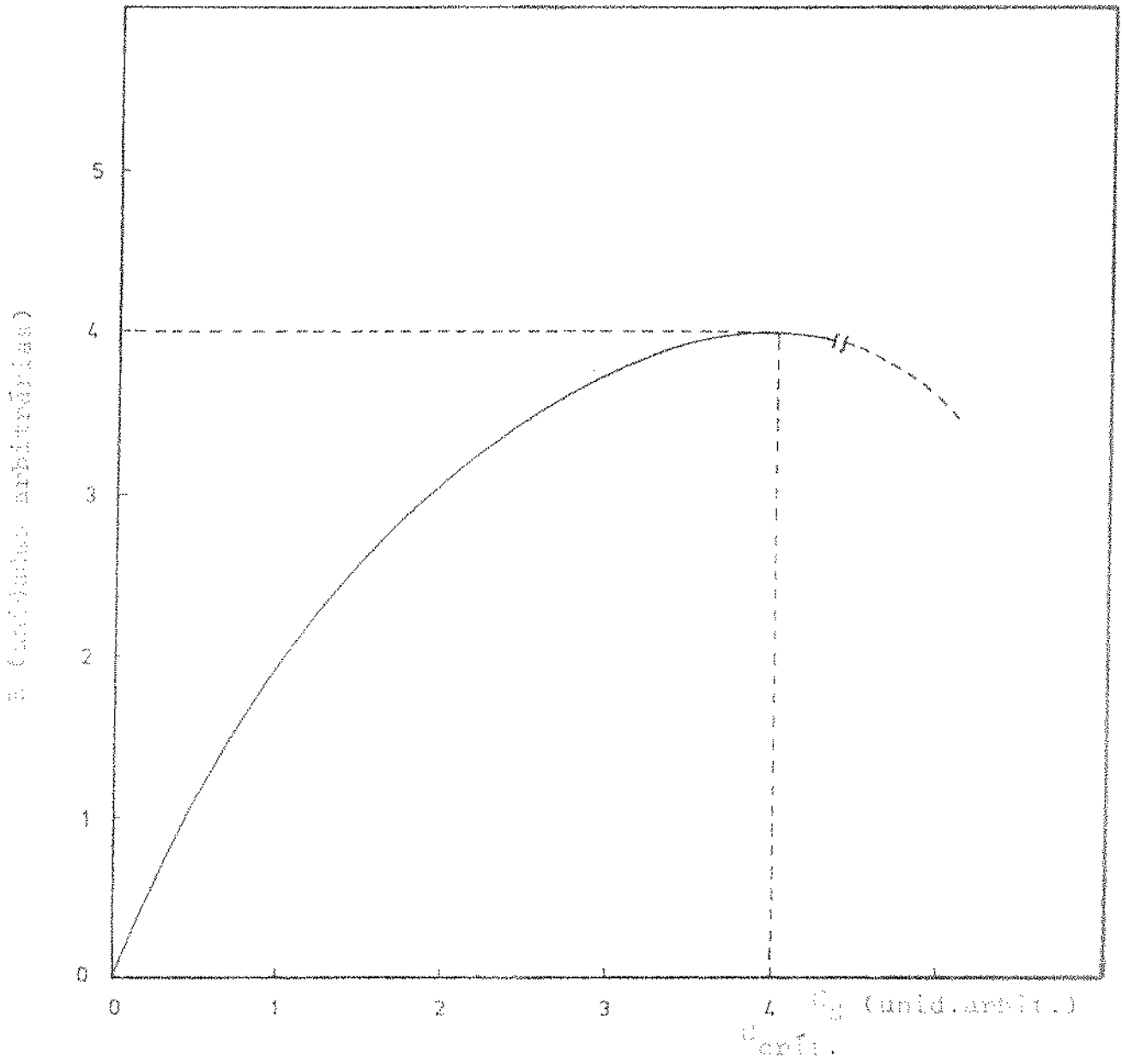


Figura 1 - Relação entre taxa de respiração k e concentração de oxigênio dissolvido C_D .

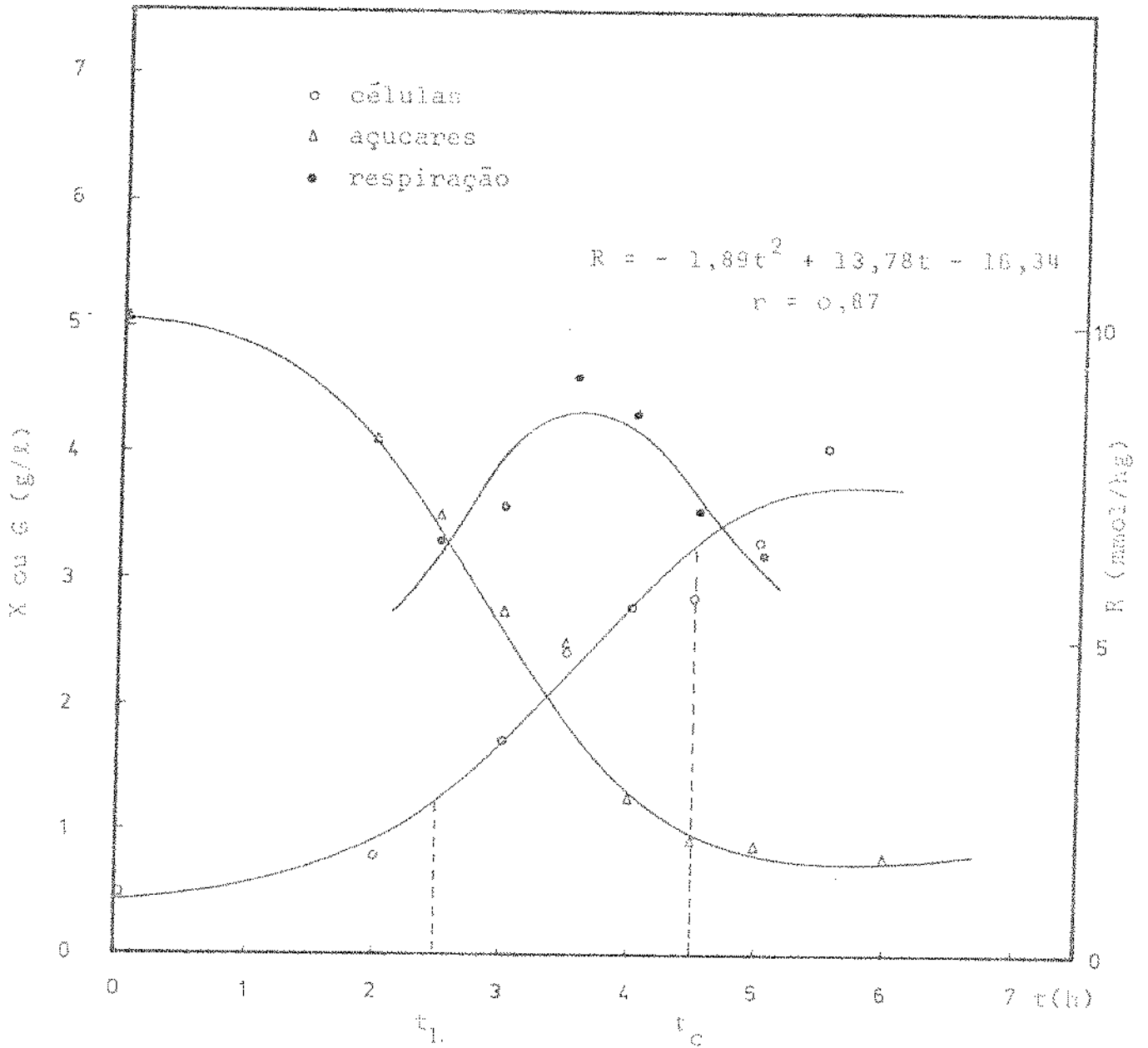


Figura 2 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,195 mg/L (2,5% da saturação).

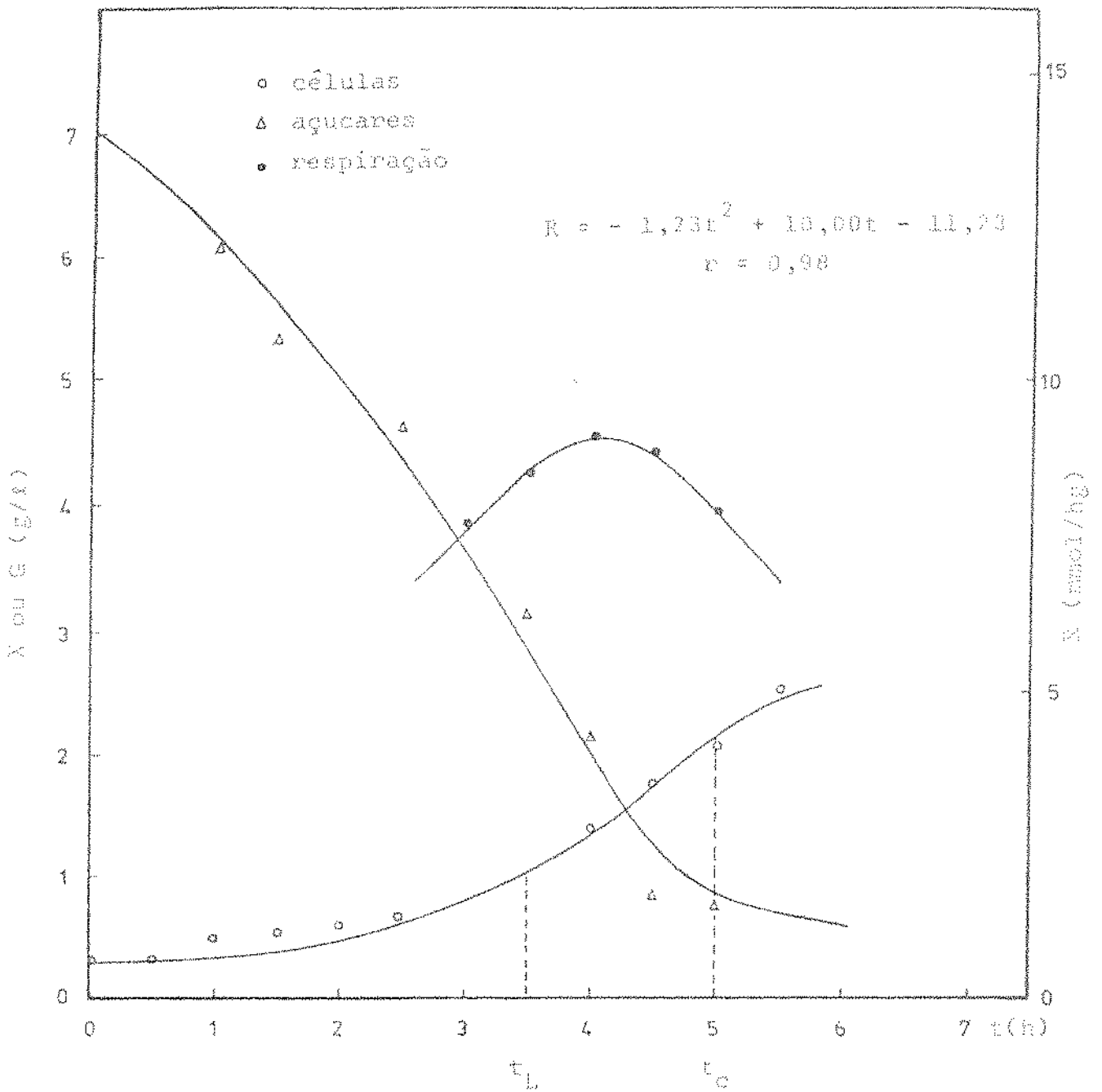


Figura 3 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,195 mg/l (2,5% da saturação).

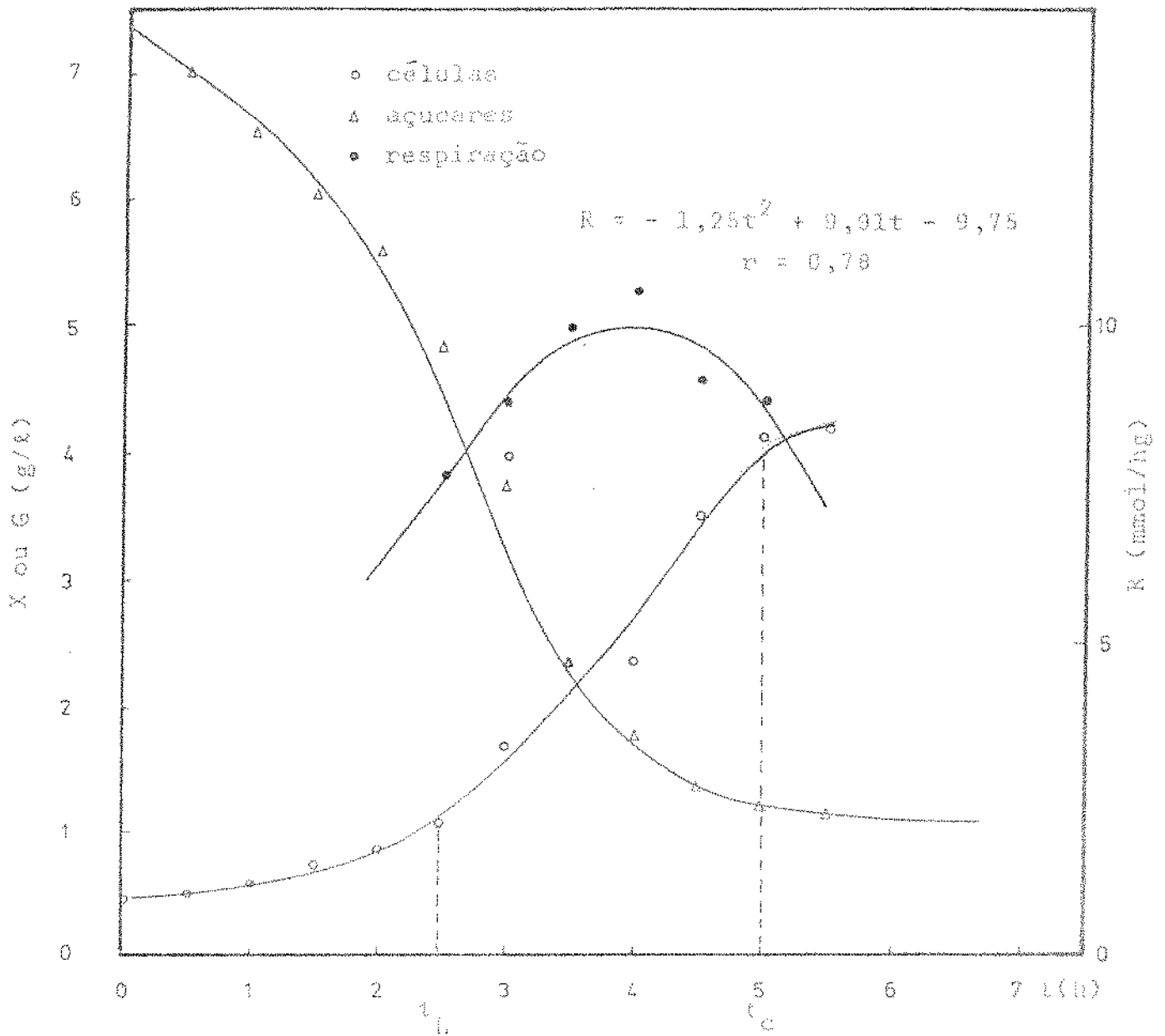


Figura 4 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,312 mg/l (4% da saturação).

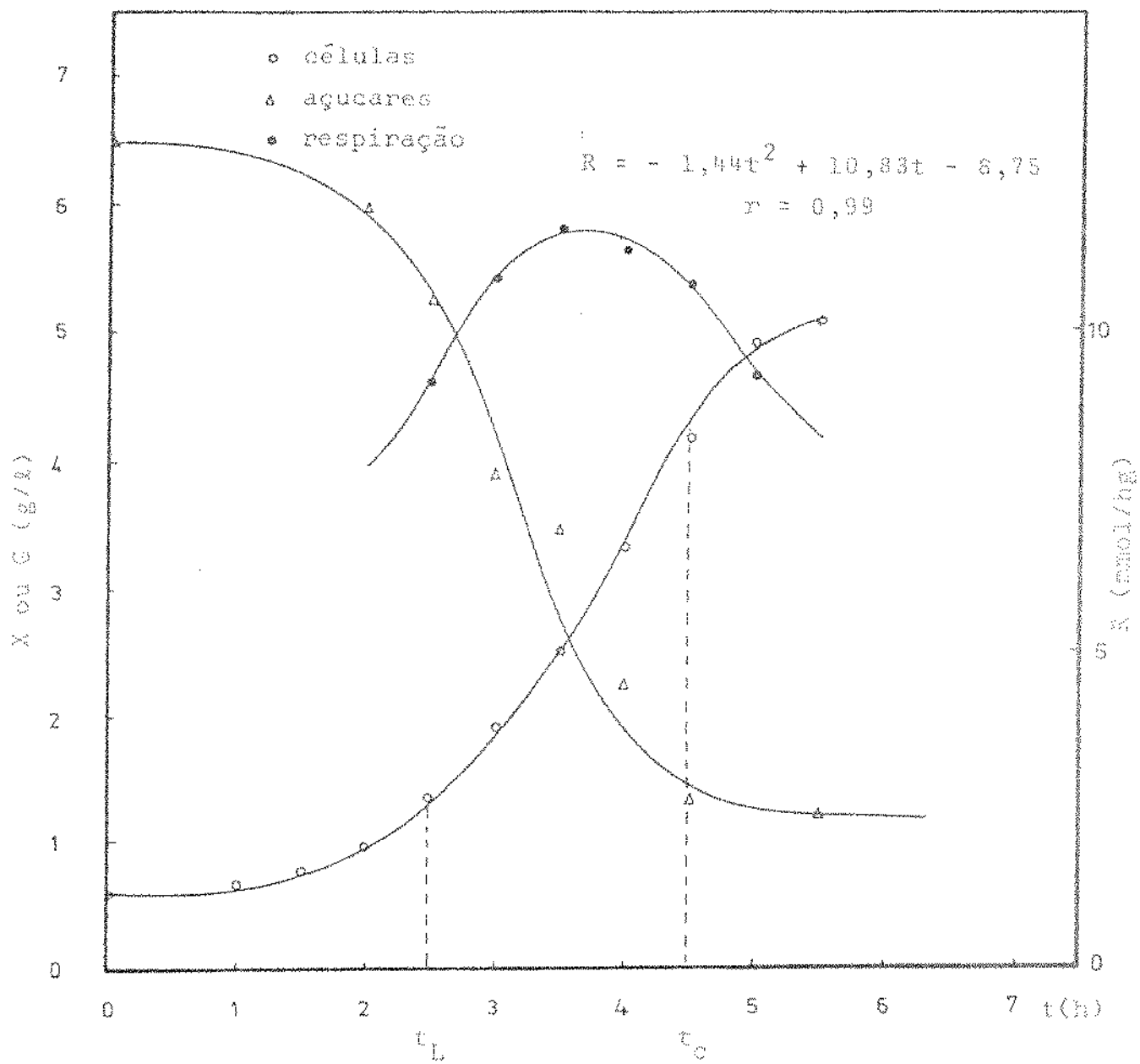


Figura 5 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,484 mg/L (6,2% da saturação).

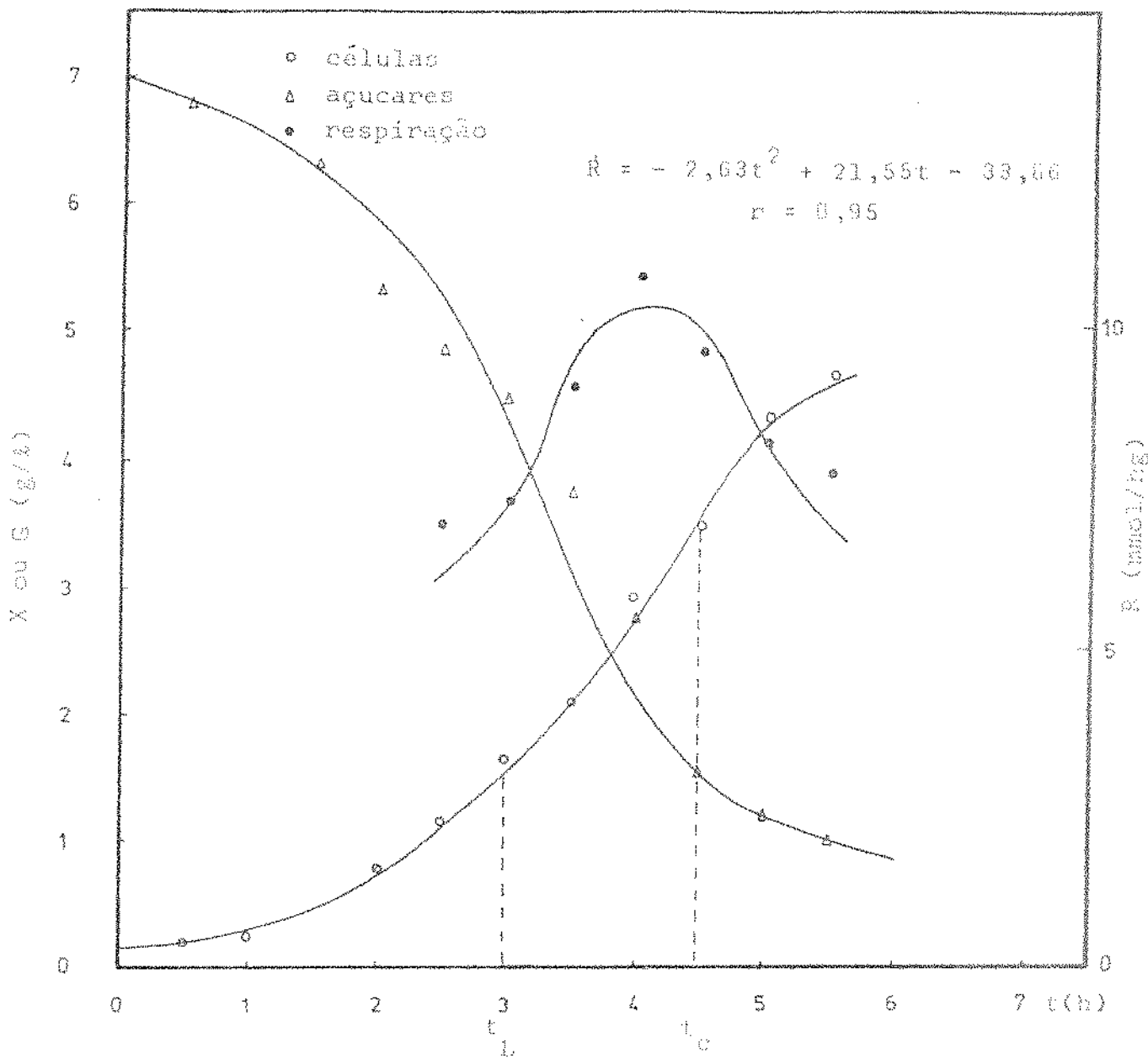


Figura 6 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,194 mg/l (8,7% da saturação).

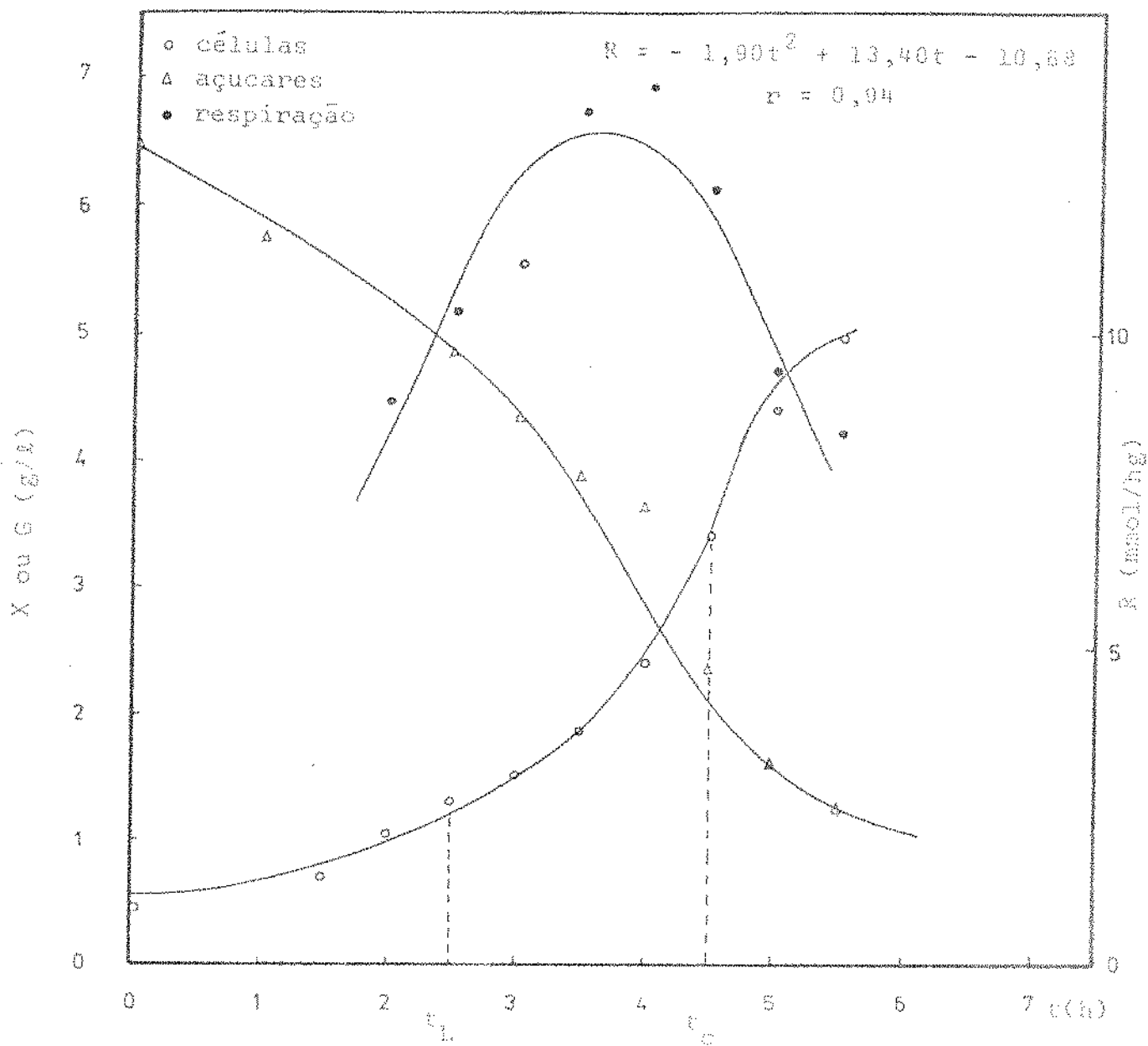


Figura 7 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,280 mg/l (10% da saturação).

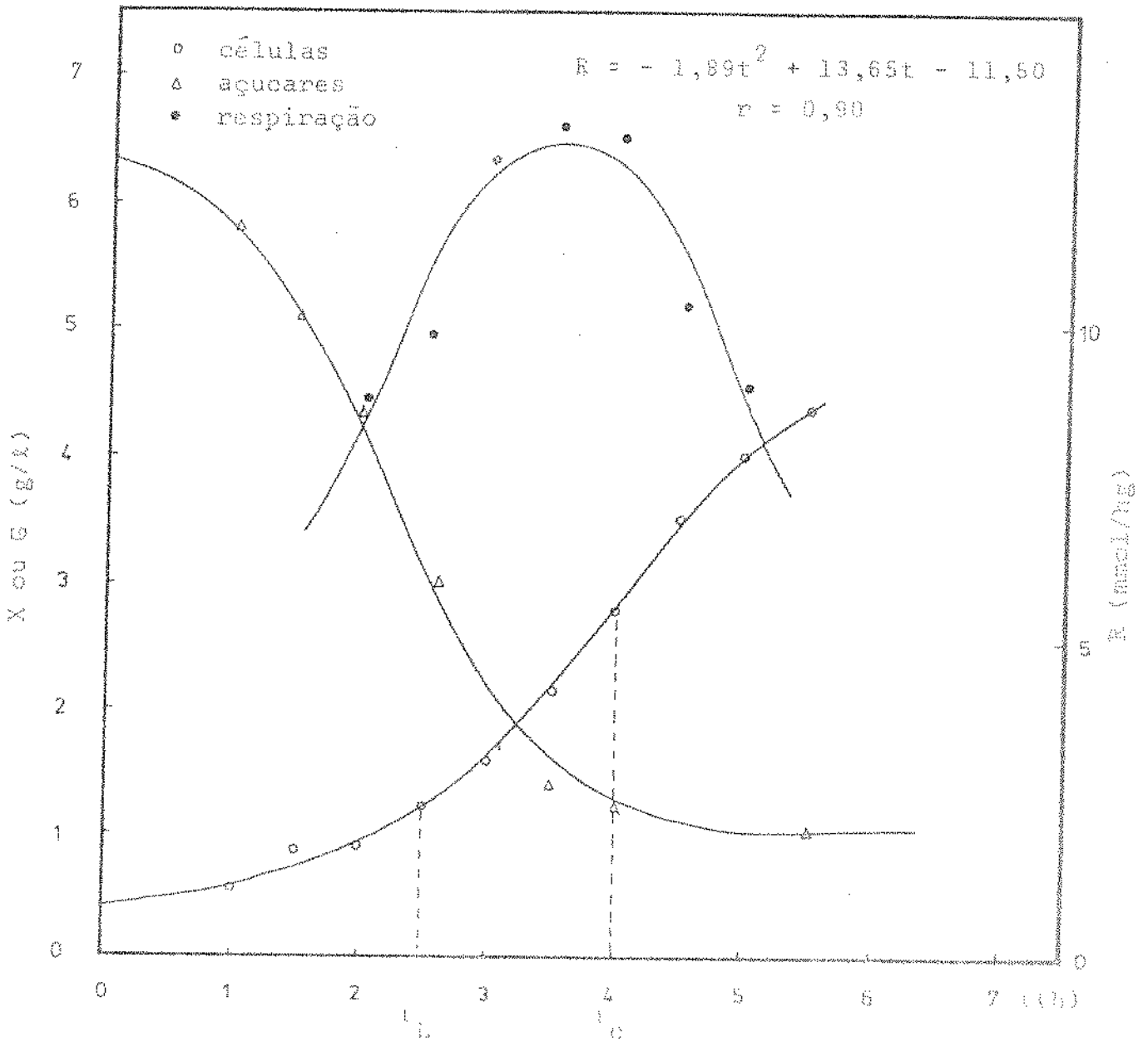


Figura 8 - Comportamento da Fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,780 mg/L (10% da saturação).

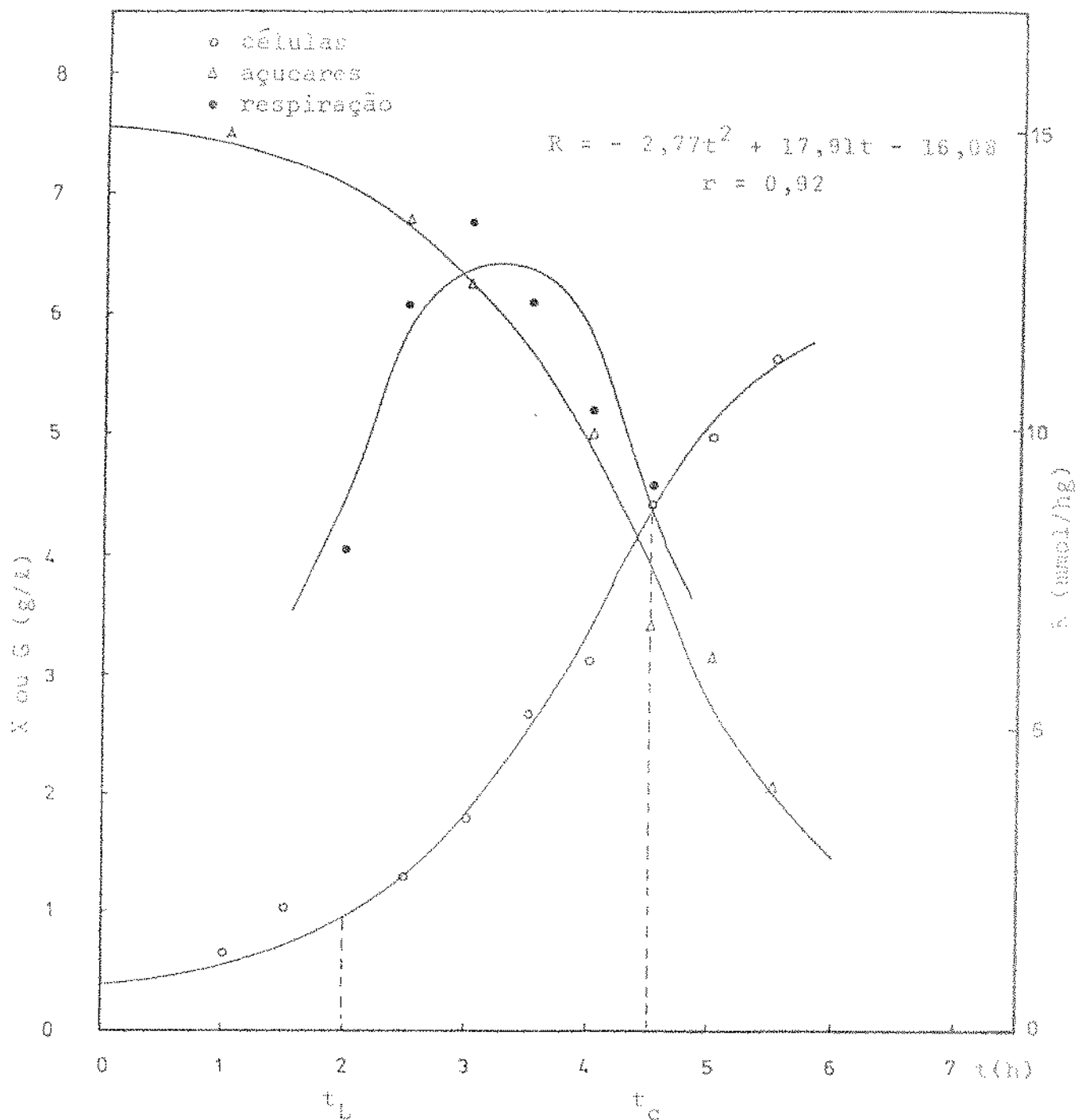


Figura 9 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 0,936 mg/l (12% da saturação).

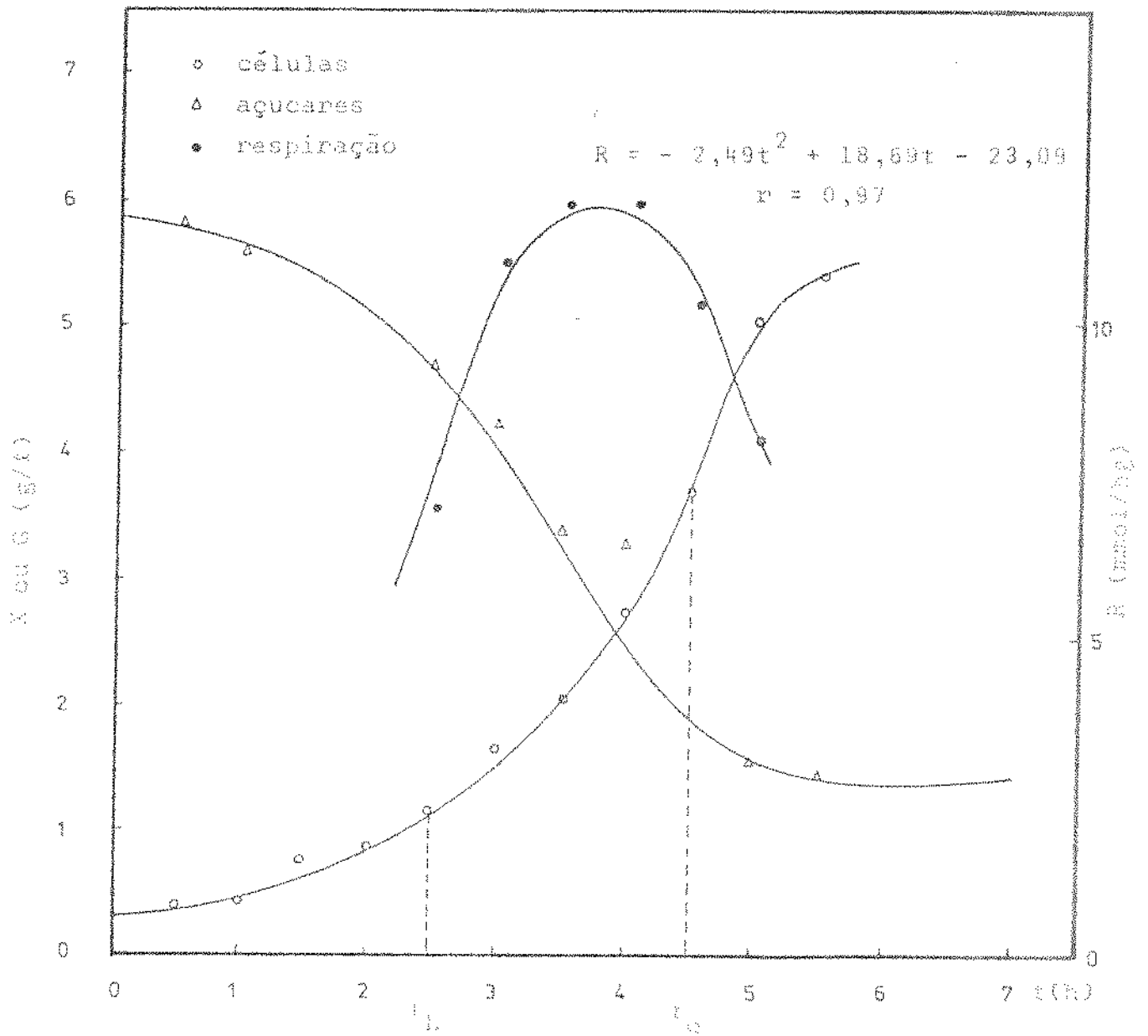


Figura 19 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 1,366 mg/l (17,5% da saturação).

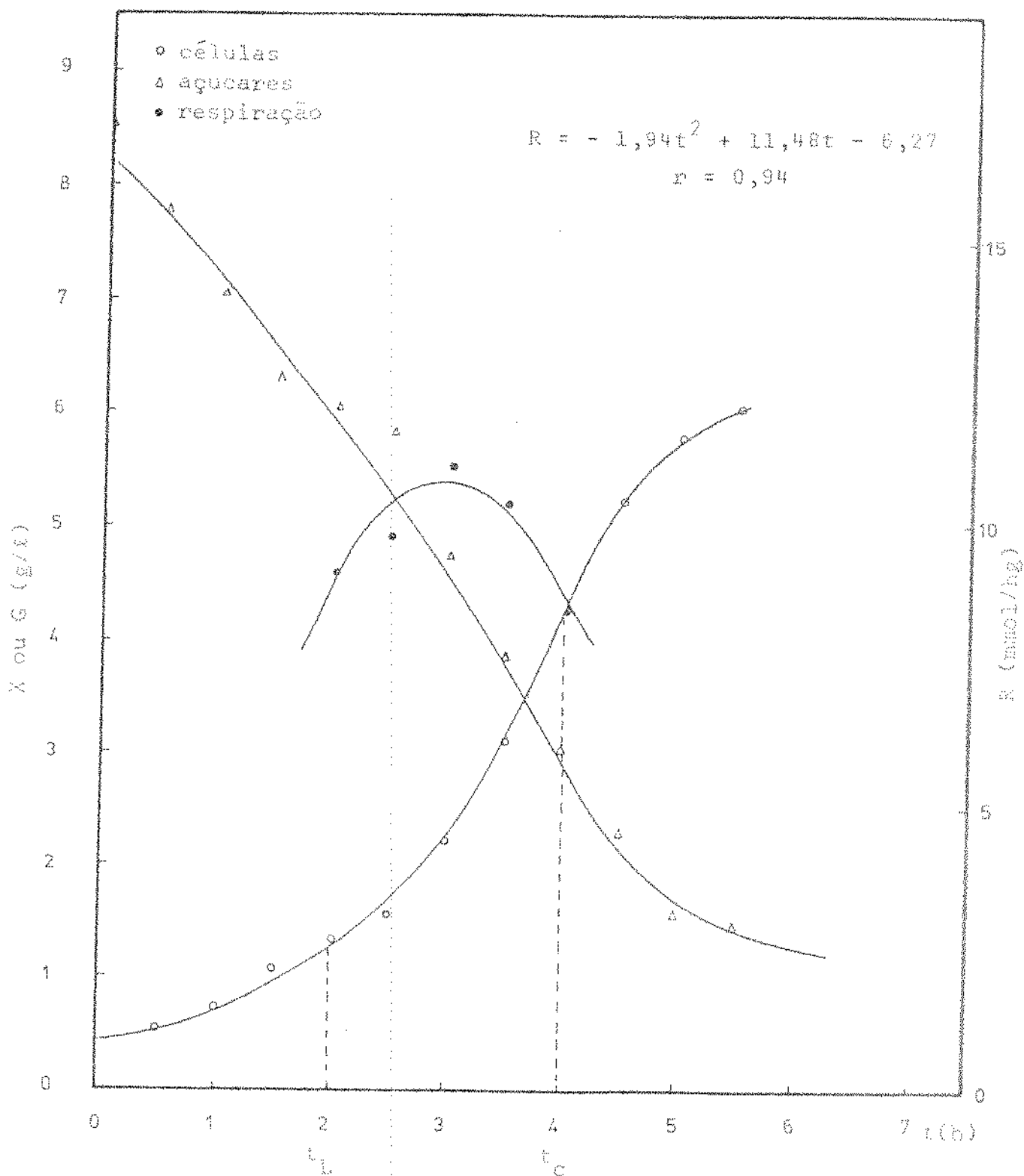


Figura 11 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 1,355 mg/l (17,5% da saturação)

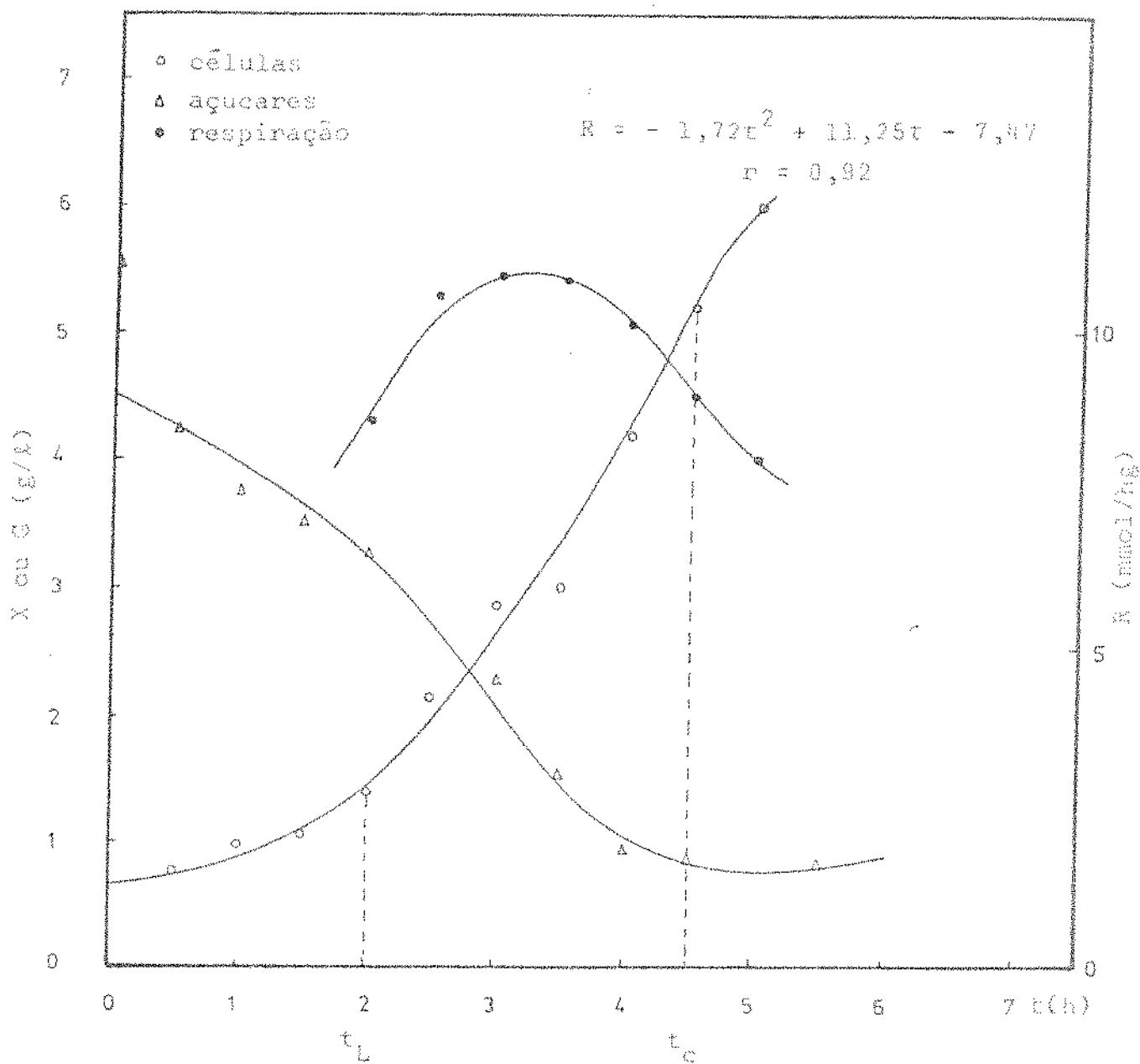


Figura 12 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 1,560 mg/l (20% da saturação).

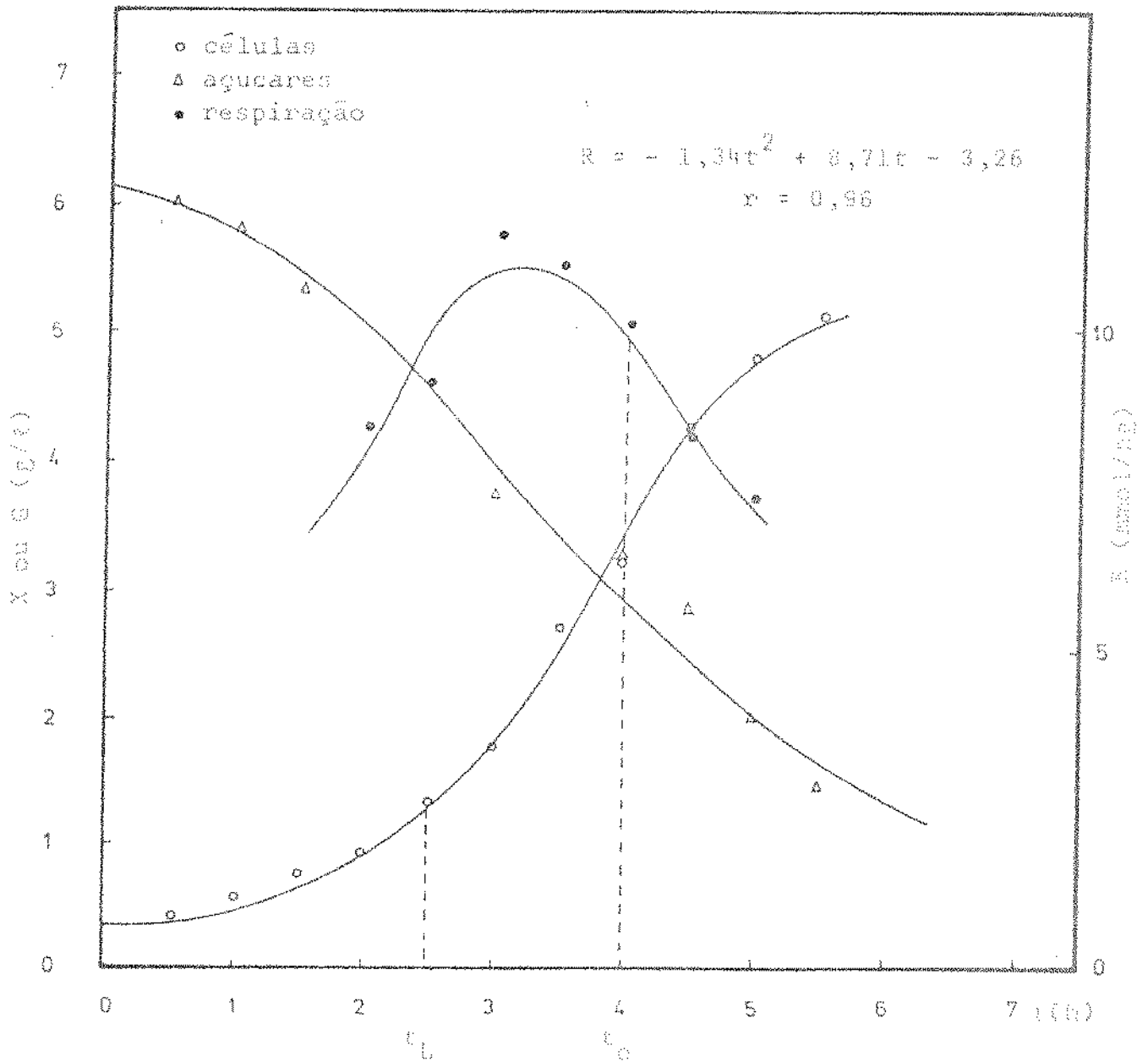


Figura 15 - Comportamento da fermentação com concentração de oxigênio dissolvido mantida em 1,5mg/l (10% de saturação).

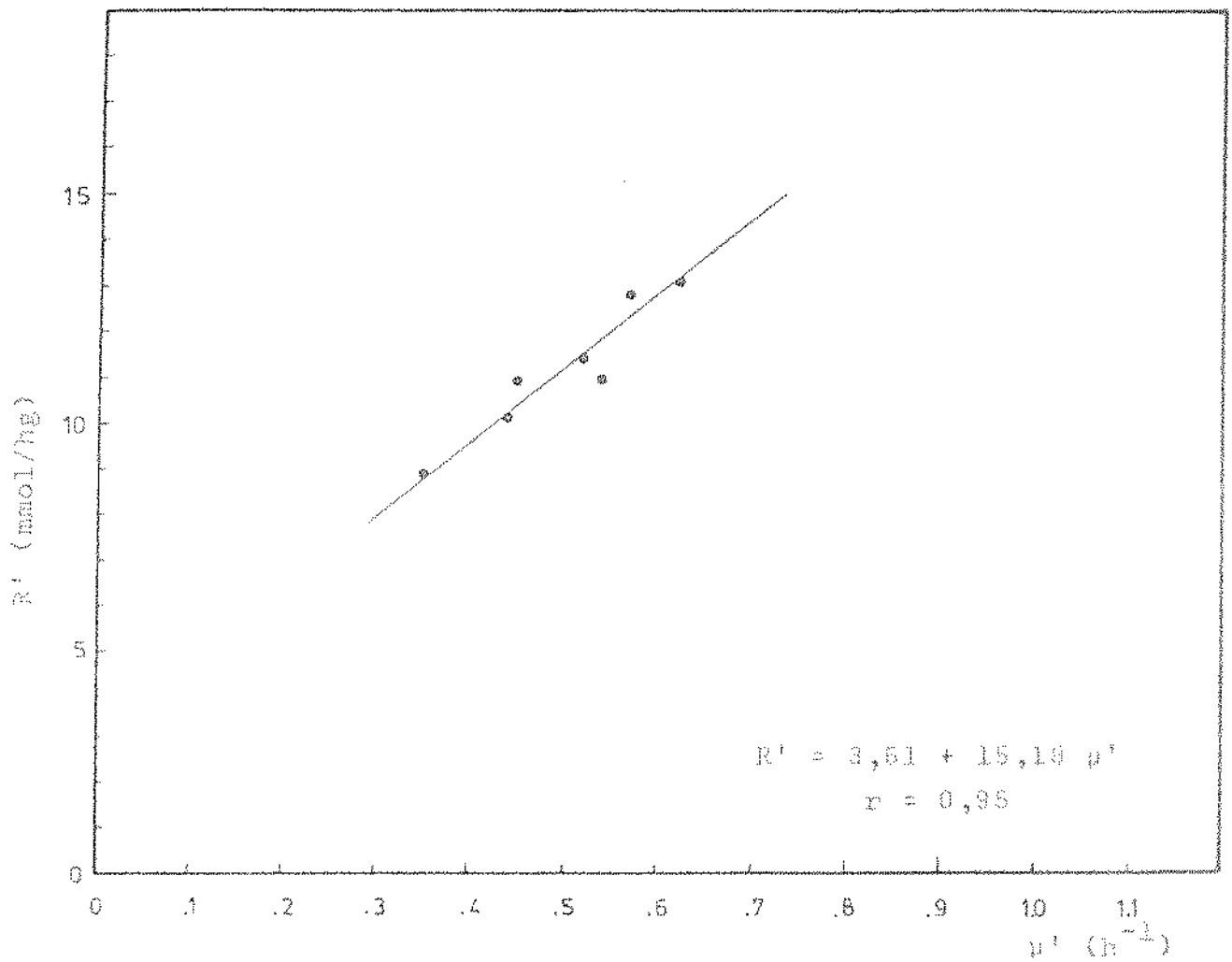


Figura 14 - Relação entre máxima taxa de respiração R' e máxima taxa específica de crescimento μ'

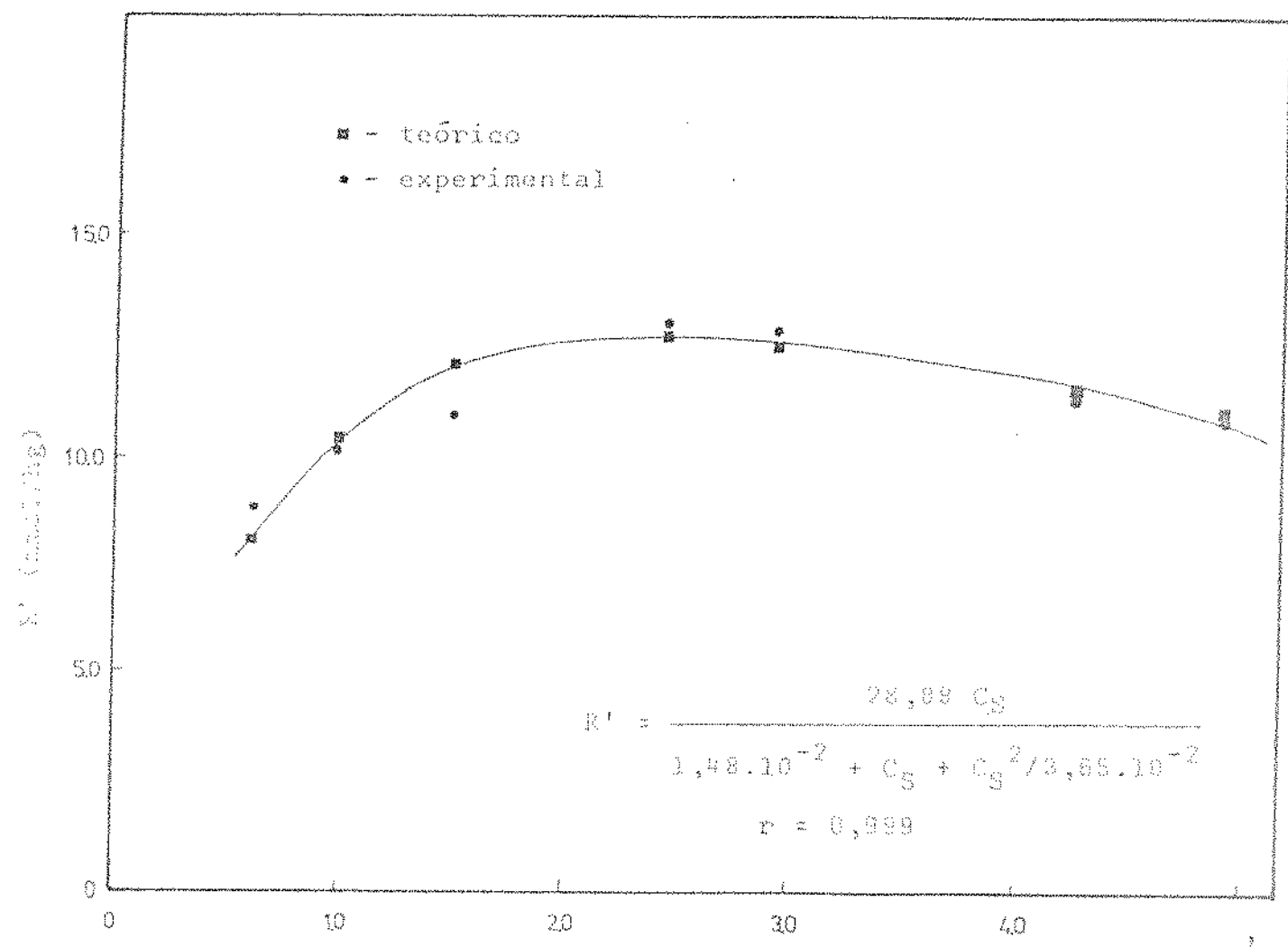


Figura 15 - Comportamento da taxa de respiração R' com a concentração de oxigênio dissolvido C_S .

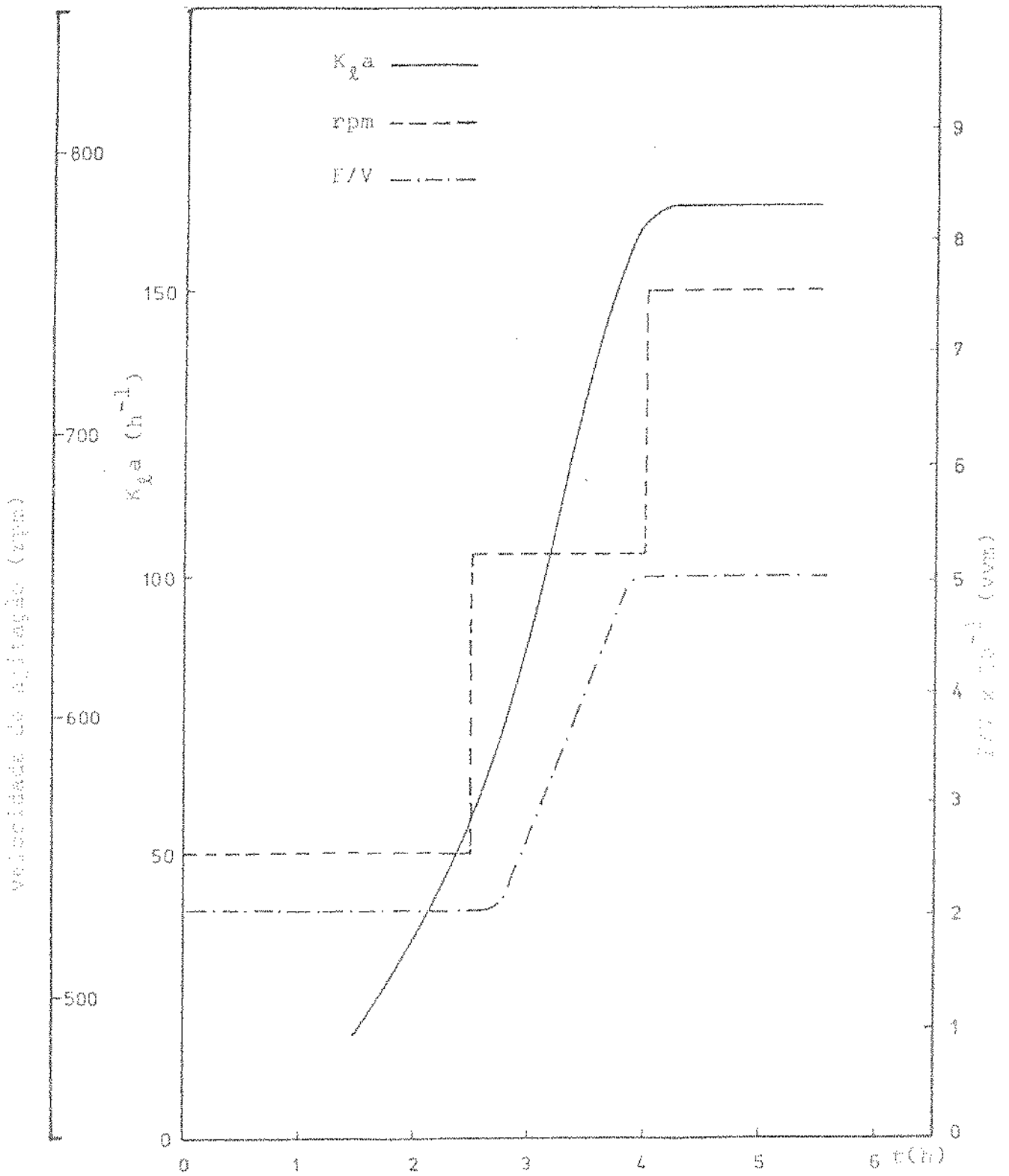


Figura 16 - Perfil proposto de K_{La} , velocidade de agitação e taxa de aeração F/V para 0,780 mg/L de oxigênio dissolvido.

TABELA I - Comportamento da taxa de respiração R' com a concentração de oxigênio dissolvido C_S e taxa específica de crescimento celular μ' .

$\frac{C_S}{C^*} \times 100$	$C_S \times 10^{-2}$ (mmol/l)	R' (mmol/hg)	μ (h ⁻¹)
2,5%	0,609	6,88	0,35
4%	0,975	10,11	0,44
6,2%	1,911	10,99	0,54
10%	2,438	13,04	0,62
12%	2,925	12,86	0,57
17,5%	4,266	11,36	0,52
20%	4,875	10,96	0,45

TABELA II - Valores das constantes cinéticas obtidas para o modelo de crescimento

$$\begin{aligned}
 R'_M &= 28,88 \text{ (mmol/hg)} \\
 K'_S &= 1,48 \times 10^{-2} \text{ (mmol/hg)} \\
 K''_S &= 3,65 \times 10^{-2} \text{ (mmol/hg)}
 \end{aligned}$$

Equação obtida:

$$R' = \frac{28,88 C_S}{1,48 \times 10^{-2} + C_S + C_S^2 / 3,65 \times 10^{-2}}$$

$$r = 0,999$$

TABELA III - Valores das constantes obtidas para a correlação empírica

$$\begin{aligned}
 K &= 25,226 \\
 \alpha &= 0,666 \\
 \beta &= 0,458
 \end{aligned}$$

Correlação obtida:

$$K_{L,a} = 25,266 \left(\frac{P}{V} \right)^{0,666} \left(v_S \right)^{0,458}$$

$$r_{1,23} = 0,94428$$

TABELA IV - Valores de $K_L a$ e dados experimentais utilizados na sua obtenção

V_S (m/h)	N (rpm)	$\ln \frac{C_\infty - C_0}{C_\infty - C}$	Δt (min)	$K_L a$ (h ⁻¹)	
6,758	672,5	1,5041	0,68	136,60	
		0,8109	0,36		
		0,5390	0,26		
		0,2336	0,12		
	750	750	1,8198	0,68	138,70
			0,9808	0,46	
			0,6325	0,30	
			0,2671	0,14	
	845	845	2,9087	1,02	180,60
			1,4816	0,56	
			0,8938	0,36	
			0,4520	0,20	
845	845	2,0104	0,75	169,61	
		1,1076	0,42		
		0,7111	0,28		
		0,3118	0,15		
845	845	2,5840	0,82	199,01	
		1,4053	0,48		
		0,8979	0,32		
		0,3327	0,14		
845	845	2,5933	0,84	188,17	
		0,8227	0,28		
		0,3961	0,14		
		0,1510	0,06		

TABELA IV - Continuação

V_S (m/h)	N (rpm)	$\ln \frac{C_\infty - C_0}{C_\infty - C}$	Δt (min)	$K_L a$ (h ⁻¹)	
10,813	672,5	2,3116	0,85	166,39	
		1,2755	0,50		
		0,6842	0,27		
		0,2552	0,11		
			2,6119	0,92	175,25
			1,7469	0,64	
			0,9071	0,34	
			0,3219	0,14	
		750	2,0370	0,64	198,01
			1,0814	0,36	
			0,5705	0,20	
			0,1910	0,08	
			2,5257	0,90	168,16
			0,9163	0,32	
			0,4463	0,16	
			0,2231	0,08	
	845	2,1401	0,57	237,11	
		1,1155	0,31		
		0,7016	0,21		
		0,4097	0,13		
			2,2773	0,60	237,08
			1,4663	0,40	
			0,7191	0,22	
			0,2404	0,08	

TABELA IV - Continuação

V_S (m/h)	N (rpm)	$\ln \frac{C_{\infty} - C_0}{C_{\infty} - C}$	Δt (min)	$K_L a$ (h ⁻¹)	
13,516	672,5	2,2336	0,77	178,67	
		0,9573	0,35		
		0,5914	0,23		
		0,1646	0,07		
			2,1282	0,88	160,28
			1,2527	0,50	
			0,5055	0,22	
			0,1728	0,10	
	750		2,6655	0,78	214,74
			1,5261	0,46	
			0,7376	0,24	
			0,3023	0,12	
			2,3936	0,70	214,72
			1,5240	0,46	
			0,5698	0,20	
			0,1905	0,08	
845		2,0232	0,54	241,22	
		0,9671	0,28		
		0,4650	0,16		
		0,2314	0,08		
			2,4773	0,64	250,33
			1,1616	0,34	
			0,4208	0,16	
			0,1657	0,08	

TABELA V - Dados experimentais obtidos no kit de agitação

N (rpm)	(P/V) (HP/m ³)	V _s (m/h)	K _{La} (h ⁻¹)
672.5	3.525	6.7580	136.60
672.5	3.619	"	138.70
750.0	4.600	"	180.60
750.0	4.712	"	169.61
845.0	5.562	"	199.01
845.0	5.689	"	188.17
672.5	3.214	19.8127	166.99
672.5	3.214	"	175.25
750.0	4.486	"	198.01
750.0	4.260	"	168.16
845.0	5.561	"	237.11
845.0	5.561	"	237.08
672.5	2.912	13.5159	178.67
672.5	2.818	"	150.28
750.0	3.704	"	214.74
750.0	3.807	"	214.72
845.0	5.052	"	241.22
845.0	5.184	"	250.33

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

1. O modelo cinético proposto neste trabalho para a taxa de respiração e concentração de oxigênio dissolvido apresentou bons resultados quando aplicado à fase logarítmica de crescimento do Bacillus thuringiensis.
2. O excesso de oxigênio no meio de cultura é prejudicial ao Bacillus thuringiensis mesmo à pressões próximas à atmosférica, acarretando uma inibição na taxa de crescimento e respiração.
3. A faixa ótima de concentrações de oxigênio para a máxima taxa de crescimento celular situou-se entre 7 a 10% do valor de saturação, para o meio constituído de 15g/l de melaço e 40g/l de água de maceração de milho.
4. Os valores máximos das taxas específicas de respiração e crescimento celular foram de 13,04 mmol/hg e $0,62 \text{ h}^{-1}$ respectivamente.
5. As fermentações desenvolveram-se em 5,5h tendo a fase logarítmica duração de aproximadamente 1,0h.
6. Os experimentos realizados e os resultados apresentados são úteis para o estabelecimento de condições

operacionais, e projeto de um fermentador industrial para esse processo.

6.2 - Sugestões

Para o projeto seguro de fermentadores industriais para produção de inseticida bacteriano de Bacillus thuringiensis alguns pontos merecem ser analisados mais profundamente, tais como:

1. A determinação da potência do inseticida obtido na faixa de máxima taxa de respiração, comparando-a às outras faixas para a seleção das condições ótimas de trabalho.
2. A determinação da localização dos efeitos perniciosos do oxigênio sobre as células, em meio quimicamente definido, visto que a inibição da taxa de respiração pode ser consequência de carência de outras substâncias provocada pelo excesso de oxigênio no meio.

Referências Bibliográficas

1. ANGUS, T.A., Symposium on microbial. Insecticides.
I. Bacterial pathogens of insects as microbial
insecticides. Bact. Review 29 (3): 364-371, 1965.
2. NORRIS, J.R., Biological methods of insect control.
Pest Articles and News Summaries, 14: 505-522, 1968.
3. SCHERRER, P. LUTHI, P. and TRUMPI BRUNO, Production
of endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function
of glucose concentrations. Applied Microbiology 25
(4): 644-646, 1973.
4. YOUSTEN, A.A. and ROGOFF, M.H., Metabolism of Bacillus
thuringiensis in relation to spore and crystal formation.
Journal of Bacteriology 100: 1229-1266, 1969.
5. BRIGGS, J.D., Comercial production of insect Pathogens.
In: "Insect Pathology" An Advanced Treatise Acad. Press
Inc. N Y. (2): 519-548, 1963.
6. BRIGGS, J.D., Mass propagation of bacteria pathogenic
for insects. Bull. Wld. Hlth. Org. 31: 495, 1964.
7. DULMAGE, N.T., Production of endotoxin by eighteen
isolates of Bacillus thuringiensis serotype 3, in 3
fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology
18: 353-358, 1971.
8. FAUST, R.M., DOUGHERTY, E.M., Standardization of the δ
endotoxin product by several varieties of Bacillus

- thuringiensis, 1. Enzime Kinetics of the tripsin Azoalbumin δ endotoxin-sistem, Journal of Economic Entomology 64 (3): 610-615, 1971.
9. BURGESS, H.D., Standardization of Bacillus Thuringiensis products: homology of the standard. Nature 215: 664, 1967.
 10. DE BARJAC, H. et all, Proposed Standardized bioassay for formulation of Bacillus thuringiensis based on the International unit. Journal of Invertebrate Pathology 18: 240-245, 1971.
 11. FISHER, R.R. and BRIGGS, J.D., Bioassay of microbial Pesticides. In "Analytical Methods for Pesticides" G. Zweig, Academic Press: 430-442, 1963.
 12. MORAES, I.O., Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. M.Sc., thesis FEA-UNICAMP, BRASIL, 1973.
 13. MORAES, I.O., Ensaios de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini fermentador. D.Sc., thesis FEA-UNICAMP, BRASIL, 1976.
 14. MORAES, I.O., HOKKA, C.O. SANTANA, M.H. and VILLARINHO A.N., Mathematical Model of growth and sporulation of Bacillus thuringiensis.
 15. AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F., Biochemical Engineering, Second edition. Tokyo, University of Tokyo Press: 1973.

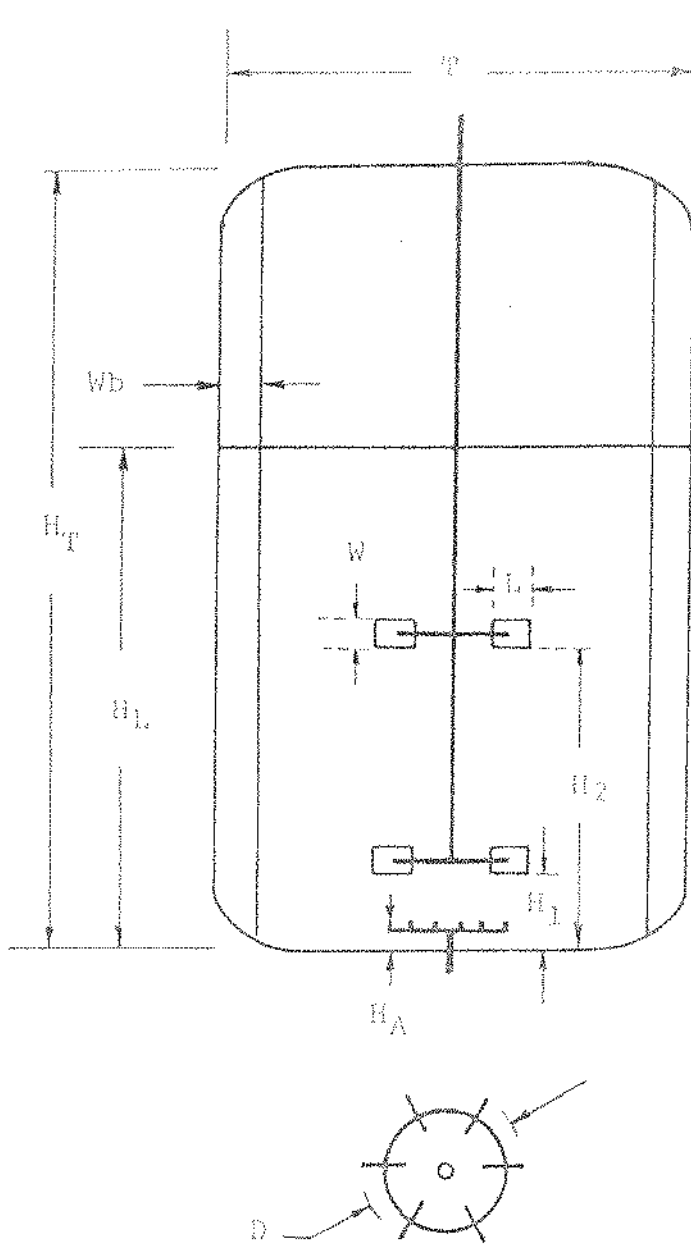
16. ELSWORTH, R., WILLAMS, V., HARRIS-SMITH, R., The effect of oxygen supply on the rate of growth of Aerobacter cloacae.
17. CALDERBANK, P.H. em "Biochemical and Biological Engineering Science" (N. Blakebrough, Ed) Academic Press, London, 1 : 101, 1967.
18. VAN DE VUSSE, J.G., Proceedings of 1st European Symposium Reaction Eng., Amsterdam 1957 Chem. Eng. Sci., 8: 72-80 1958.
19. HOSPODKA, I., Oxygen Absorption Rate-Controlled Feeding of Substrate into Aerobic Microbial Cultures Biotechnology and Bioengineering, 8: 117-134, 1966.
20. BROWN, D.E., em "Methods in Microbiology", (J.R. Ribbons, Ed.), Academic Press, London, 2: 125, 1970.
21. CHANCE, B., JAMISON, D., COLES, H., Nature, London : 237, 1965.
22. BARTHLEY, W. BROOMHEAD, V.M., The effect of oxygen concentration on the growth and metabolism of Saccharomyces cerevisiae grown with excess of potassium or in potassium-deficient media. Biochemical Journal, 130: 251-258, 1972.
23. BÉGIN-HEICK, N. and J.J. BLUM, Oxygen Toxicity in Astasia. Biochemical Journal 105: 813-819, 1967.
24. CALDERBANK, P.H., Physical Rate Processes in Industrial Fermentation - Part I, Trans. Instn. Chem. Engrs., 36: 443-463, 1958.

25. FIGUEIREDO, M.M.L., The physical and mass transfer properties of gas dispersions in mixing vessels. D.Sc., thesis University of Edinburgh, 1978.
26. COOPER, C.M., FERNISTROM, G.A. MILLER, S.A., Performance of Agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36: 504-509, 1944.
27. BARTHOLOMEU, W.H., KAROW, E.O., SPAT, N.R. and WILHELM, R.H., Oxygen Transfer and Agitation in Submerged fermentations-Mass Transfer in submerged fermentation of Streptomyces griseus. Ind. Eng. Chem. 42: 1801-1815, 1950.
28. HIXON, A.W. and GASEN, E.L., Oxygen Transfer in submerged fermentations. Ind. Eng. Chem. 42: 1792-1801, 1950.
29. TAGECHI, H. and HUMPHREY, A.E., Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. J. Ferm. Tech. Japan 44: 881, 1966.
30. TUFFILE, C.M. and PINHO, F., Determination of Oxygen transfer coefficients in viscous Streptomyces fermentations. Biotech. and Bioeng. 12, 849-871, 1970.
31. CALDERBANK, P.H., Physical Rate Processes in industrial fermentation Part II, Trans. Instn. Chem. Engrs., 37: 173-185, 1959.
32. CHAYKIN, S., In Biochemistry Laboratory Technique, J. Wiley, New York, 1966.

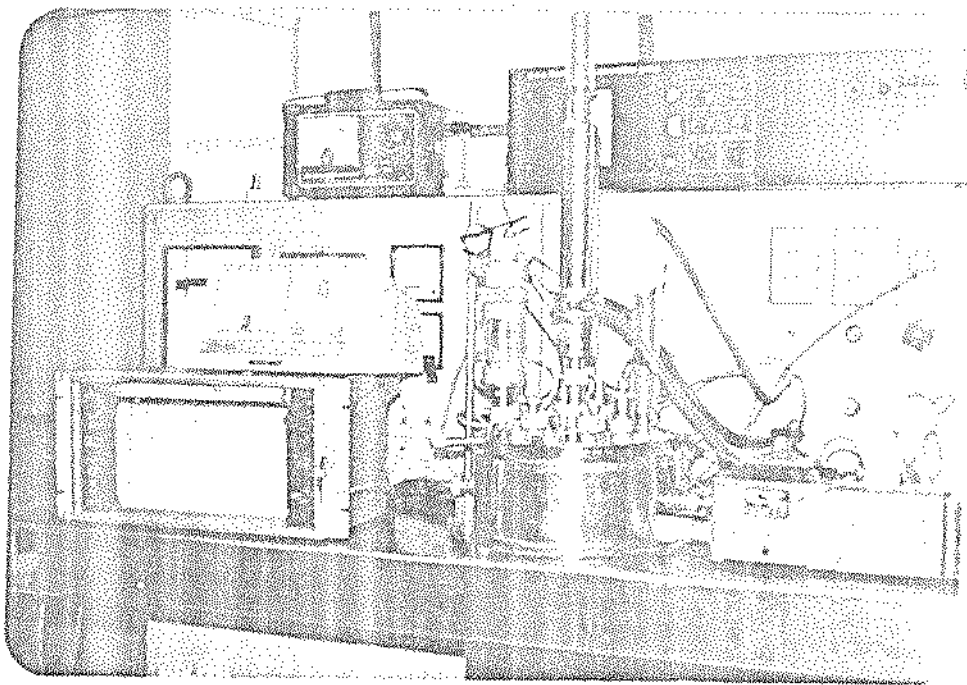
NOMENCLATURA

C_{ℓ}	- concentração de oxigênio dissolvido	(mmol/l)
C_S	- concentração de oxigênio dissolvido quando esse é o substrato limitante do processo.	(mmol/l)
C_m	- concentração de oxigênio na superfície de célula.	(mmol/l)
C^*	- concentração de saturação para o oxigênio na solução.	(mmol/l)
C_E	- concentração de enzima.	(mmol/l)
C_{ES}	- concentração do complexo enzima-substrato.	(mmol/l)
E	- enzima.	
ES	- complexo enzima-substrato.	
ES_2	- complexo enzima-substrato.	
P	- produto.	
R	- taxa de respiração celular.	(mmol/l)
R'	- taxa máxima de respiração celular correspondente a uma constante concentração de oxigênio.	(mmol/l)
F	- vazão de ar	l/min
L_S	- concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com o ar de saída do fermentador.	ppm
V_S	- velocidade superficial do ar.	m/h
P_g	- potência aplicada ao agitador.	HP/m ³
μ	- taxa específica de crescimento	h ⁻¹
μ'	- máxima taxa específica de crescimento para a fase logarítmica correspondente a uma constante	

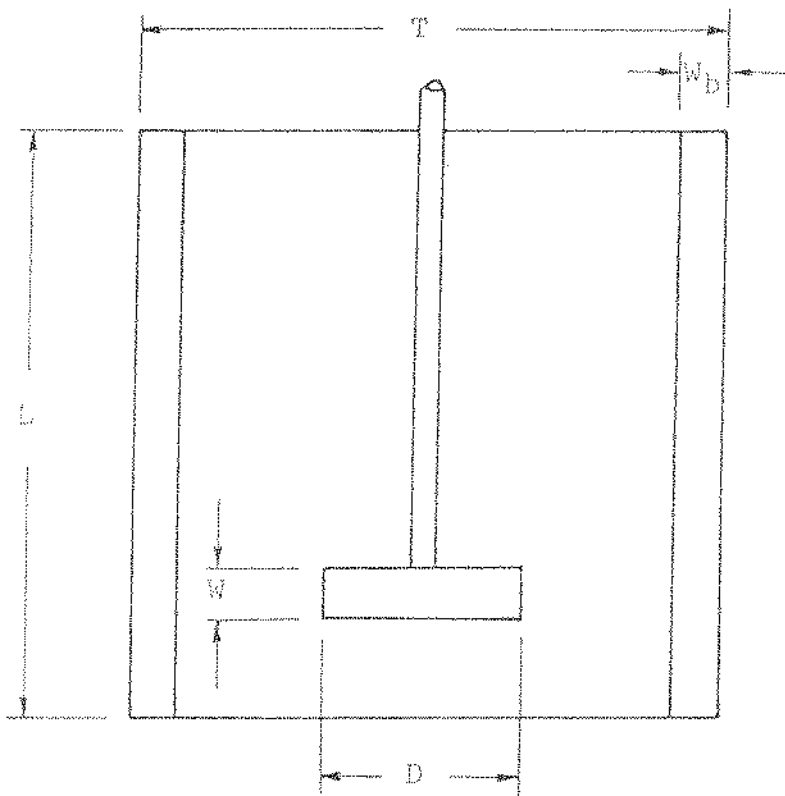
	concentração de oxigênio dissolvido.	h^{-1}
X	- concentração celular.	g/l
K_{2a}	- coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.	h^{-1}
K_S, K''_S	- constantes cinéticas.	g/l
R'_M	- constante cinética.	(mmol/hg)
K_1, K_2, K_3, K_4, K_5	- constantes de equilíbrio.	
D'	- diâmetro médio de microrganismo.	(m)
D_L	- difusividade do oxigênio no líquido.	(m^2/h)
Y_S	- constante de rendimento (g células/g substrato)	
n	- número de partículas ou moles.	
G	- concentração de açúcares redutores.	g/l
t_L	- início da fase logarítmica.	h
t_C	- fim da fase logarítmica.	h



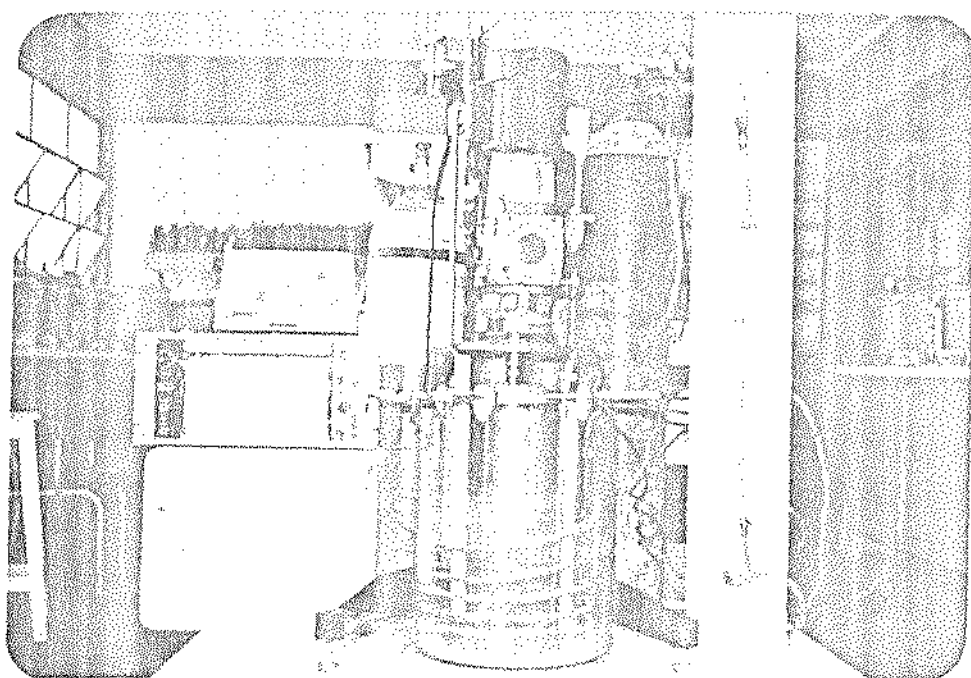
Anexo I - Diagrama do Fermentador utilizado



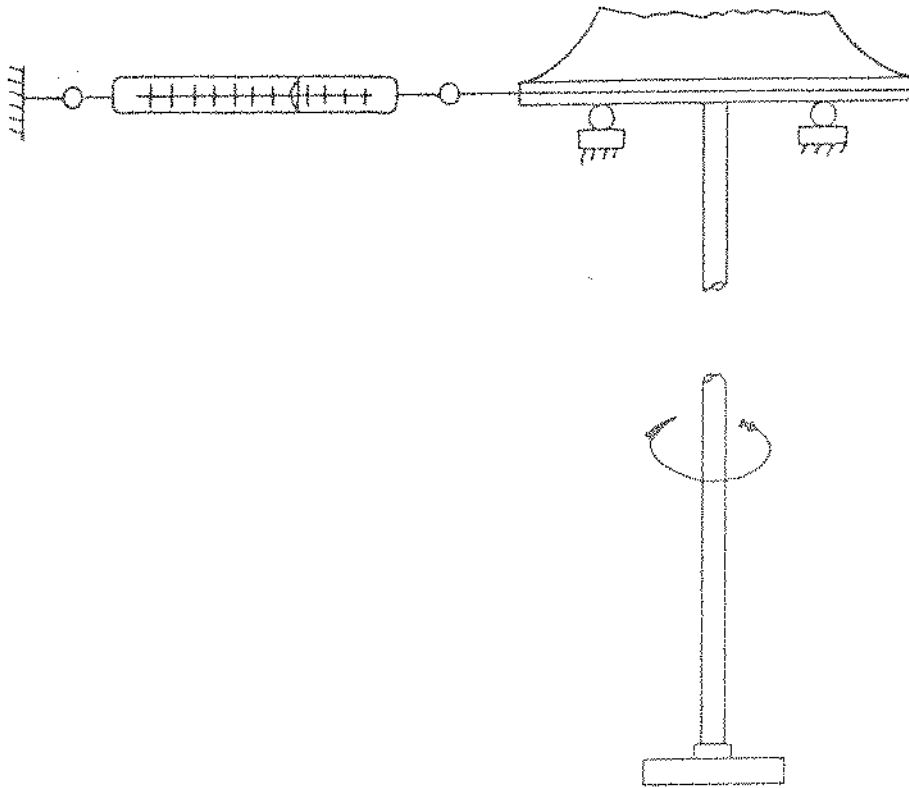
Anexo 11 - Aspecto geral do fermentador utilizado



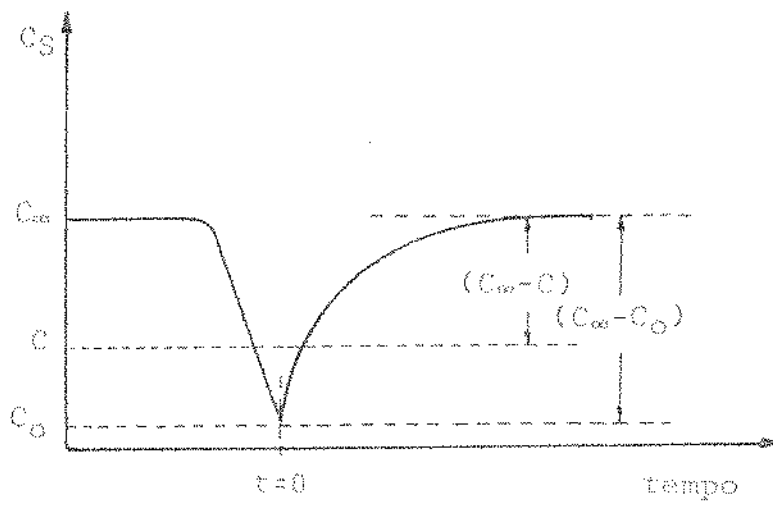
Anexo III - Diagrama do Kit de agitação utilizado



Anexo IV - Aspecto geral do Kit de agitação utilizado



Anexo V - Esquema do sistema utilizado para medida do torque.



Anexo VI - Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, em regime variável.

Anexo VI - Dados experimentais usados na construção das figuras 1 a 13.

$$C_S = 0,195 \text{ mg/l (2,5\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,54	5,09	-
2,0	0,77	4,125	-
2,5	1,22	3,50	6,61
3,0	1,71	2,75	7,08
3,5	2,42	2,00	9,18
4,0	2,78	1,25	8,65
4,5	3,00	0,94	7,12
5,0	3,30	0,87	-
5,5	4,05	0,78	-

$$C_S = 0,195 \text{ mg/l (2,5\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,28	-	-
0,5	0,30	7,76	-
1,0	0,50	6,06	-
1,5	0,53	5,45	-
2,0	0,60	5,33	-
2,5	0,67	4,61	-
3,0	0,85	3,76	7,74
3,5	1,03	3,03	8,54
4,0	1,40	2,18	9,11
4,5	1,70	0,81	8,86
5,0	2,06	0,81	7,91
5,5	2,52	0,77	-

$$C_S = 0,312 \text{ mg/l (4\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,42	7,76	-
0,5	0,46	7,03	-
1,0	0,56	6,54	-
1,5	0,73	6,06	-
2,0	0,36	5,57	-
2,5	1,05	4,85	7,59
3,0	1,70	3,75	7,97
3,5	2,27	2,36	9,97
4,0	2,36	1,76	10,53
4,5	3,48	1,39	9,17
5,0	4,14	1,21	8,75
5,5	4,19	1,13	-

$$C_S = 0,434 \text{ mg/l (6,2\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,62	6,5	-
1,0	0,66	6,3	-
1,5	0,75	-	-
2,0	0,94	6,0	-
2,5	1,35	5,25	9,21
3,0	1,91	3,87	10,85
3,5	2,50	3,50	11,61
4,0	3,32	2,25	11,24
4,5	4,18	1,31	10,73
5,0	4,88	1,28	9,34
5,5	4,89	1,25	-

$$C_g = 0,484 \text{ mg/l (6,2\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,19	6,79	-
0,5	0,21	6,5	-
1,0	0,23	-	-
1,5	-	6,30	-
2,0	0,79	5,33	8,97
2,5	1,15	4,85	9,93
3,0	1,64	4,48	12,78
3,5	2,00	3,76	13,21
4,0	2,97	2,79	13,03
4,5	3,47	1,22	9,11
5,5	4,66	1,05	-

$$C_g = 0,780 \text{ mg/l (10\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,44	6,50	-
1,0	0,91	5,75	-
1,5	0,7	-	-
2,0	1,04	-	-
2,5	1,30	4,87	9,93
3,0	1,50	4,37	12,78
3,5	1,85	3,87	13,21
4,0	2,40	3,62	13,03
4,5	3,39	2,37	10,35
5,0	4,73	1,53	9,11
5,5	4,94	1,00	-

$$C_S = 0,780 \text{ mg/l (10\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,43	6,30	-
0,5	-	-	-
1,0	0,57	5,87	-
1,5	0,36	5,09	-
2,0	0,90	4,36	-
2,5	1,22	-	10,36
3,0	1,58	3,63	11,05
3,5	2,14	-	13,44
4,0	2,79	-	13,81
4,5	3,51	1,57	12,22
5,0	3,99	1,21	8,75
5,5	4,38	1,03	-

$$C_S = 0,936 \text{ mg/l (12\% da saturação)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,39	7,5	-
0,5	0,46	-	-
1,0	0,65	7,49	-
1,5	1,02	-	-
2,0	-	-	8,08
2,5	1,33	6,78	12,14
3,0	1,80	6,30	13,46
3,5	2,66	-	12,14
4,0	3,11	5,09	10,38
4,5	4,41	3,39	9,16
5,0	4,96	3,15	-
5,5	5,61	2,06	-

$$C_S = 1,305 \text{ mg/l (12\% da satura\c{c}\~{a}o)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,33	7,03	-
0,5	0,40	5,82	-
1,0	0,44	5,57	-
1,5	0,77	-	-
2,0	0,87	-	4,76
2,5	1,16	4,72	7,15
3,0	1,67	4,24	11,05
3,5	2,08	3,39	11,96
4,0	2,75	3,27	12,06
4,5	3,70	-	10,86
5,0	5,04	1,57	8,22
5,5	5,39	1,45	-

$$C_S = 1,30 \text{ mg/l (17,5\% da satura\c{c}\~{a}o)}$$

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,45	8,72	-
0,5	0,53	7,27	-
1,0	0,73	7,03	-
1,5	1,08	6,30	-
2,0	1,32	6,06	9,18
2,5	1,75	5,82	9,79
3,0	2,20	4,72	11,01
3,5	3,08	3,88	10,39
4,0	4,20	3,03	8,53
4,5	5,24	2,30	-
5,0	5,75	1,67	-
5,5	6,00	1,47	-

$C_s = 1,560 \text{ mg/l}$ (20% da saturação)

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,66	5,57	-
0,5	0,75	4,24	-
1,0	0,98	3,75	-
1,5	1,06	3,51	-
2,0	1,41	3,27	8,56
2,5	2,15	-	9,07
3,0	2,88	2,30	11,25
3,5	3,00	1,57	11,02
4,0	4,21	0,94	10,12
4,5	5,23	0,87	8,28
5,0	6,04	-	-
5,0	6,04	-	-
5,5	6,91	0,86	-

$C_s = 1,560 \text{ mg/l}$ (20% da saturação)

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	R (mmol/hg)
0	0,21	7,51	-
0,5	0,44	6,06	-
1,0	0,59	5,81	-
1,5	0,78	5,33	-
2,0	0,91	5,33	8,59
2,5	1,31	-	10,62
3,0	1,75	3,75	10,87
3,5	2,71	4,24	10,69
4,0	3,22	3,27	10,09
4,5	4,28	2,90	9,06
5,0	4,80	2,06	-
5,5	5,13	1,45	-

AGRADECIMENTOS

À professora Iracema de Oliveira Moraes pela orientação eficiente.

Ao professor Carlos Osamu Hokka pela inestimável ajuda na parte experimental.

Ao professor João Pereira pelas discussões.

Ao professor Elias Tambourgi pela colaboração no trabalho de computação.

Aos técnicos José Antonio Quirino, Maria Izabel Rodrigues e Fátima Aparecida de Almeida pela dedicada colaboração nas análises de laboratório.

A FAPESP pela ajuda financeira.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

À Odette Repello pela datilografia.