

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Engº. Químico CARLOS EDUARDO VAZ ROSSELL
Mestre em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO DE PENICILINAMIDAHIDROLASE POR ESCHERICHIA COLI.

Cinética de crescimento e produção da enzima.
Dependência da transferência de oxigênio na
intensidade de agitação e aeração. Ampliação
de escala.

ORIENTADOR

Prof. Dr. FUMIO YOKOYA

Livre Docente

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Doutor em Ciências.

1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A Regina y Reginita

I N D I C E .

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	55
QUADROS, FIGURAS E TABELAS	57
APÊNDICE	103
NOMENCLATURA	109
BIBLIOGRAFIA	113

RESUMO

Foi estudada a produção de penicilina amidahidrolase (PAH) por fermentação com Escherichia coli ATCC 9637, em fermentadores de laboratório, banco e piloto. No meio de fermentação empregado, baseado em água de maceração de milho, a cinética de crescimento apresenta duas fases exponenciais sucessivas. A mudança de uma a outra é provocada pela limitação de oxigênio dissolvido.

A programação do incremento da taxa de transferência de o xigênio em função do tempo controla a duração relativa de ambas as fases. A velocidade específica de crescimento no primeiro período (μ_I) foi bem maior que no segundo (μ_{II}). A produção de PAH segue uma cinética exponencial, ficando associada ao crescimento celular e sendo maior quanto menor o valor de μ_{II} .

Quando μ tende a μ_{max} . não se tem o acúmulo de enzima. São condições necessárias para a produção de PAH a adição de ácido fenilacético como indutor e a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido a valores muito baixos.

Foi desenvolvido um modelo cinético para a produção de PAH, baseado nas variáveis mencionadas.

A fermentação foi ampliada de escala de um fermentador banco com 10 litros de meio até um fermentador piloto com 15 a 20 vezes este volume de meio de fermentação. Entre ambas unidades não se manteve similaridade geométrica.

O critério seguido na ampliação da escala foi a de manter as velocidades tangenciais no agitador na mesma ordem para o modelo e o protótipo, a porcentagem da tensão de oxigênio dissolvido próxima de zero, ajustando a taxa de transferência de oxigênio máxima e o coeficiente volumétrico de transferência de massa ($k_1 a$) mediante a taxa de aeração. De uma análise dos resultados obtidos experimentalmente concluiu-se que ($k_1 a$) ou a área interfacial (a) podem ser descritos mediante as correlações de Yoshida para $k_1 a$ ou de Calderbank para a , desde que seja substituído nas mesmas a velocidade de aeração associada com a secção transversal do fermentador (V_s) pela velocidade de aeração associada com

a secção total dos orifícios do distribuidor. Os rendimentos de PAH foram da mesma ordem em escala banco e piloto.

SUMMARY

Penicillinamidohydrolase (PAH) production by Escherichia coli ATCC 9637 was studied in laboratory, bench and pilot scale fermentors. Using a culture medium based on corn steep liquor, it was shown that kinetics of growth has two successive exponential phases. The shift from one to the other is caused by limitation of dissolved oxygen.

The relative length of those phases can be controlled by programming the increment of oxygen transfer rate with time. The specific growth rate during the first period is larger than the second period. PAH production follows exponential kinetics and it is associated with cell growth being larger if the second growth phase shows the slower rate (μ_{II})

When the μ_{II} value approaches the μ_{max} no enzyme accumulation was observed.

The conditions required for PAH production were the addition of phenylacetic acid as inducer and the maintenance of dissolved oxygen concentration at very low level.

A kinetic model for the production of PAH was developed based on the variables above mentioned. Fermentation was scaled-up from a bench fermentor with ten liters of medium to a fermentor with 15-20 times larger volume. Geometric similarity was not maintained between those units.

The criteria followed for scaling-up were to maintain a similar peripheral velocity at the tip of the impeller between model and prototype, and the percent of dissolved oxygen tension near zero. Adjustment of the maximum oxygen transfer rate and volumetric mass transfer coefficient (k_1a) was accomplished by changing air rate.

It was concluded, from experimental data, that (k_1a) or the interfacial area (a) can be described by the correlation of Yoshida for k_1a or Calderbank for a , if the surface air velocity at the cross section of the fermentor (V_s) is replaced by air velocity at the total area of holes in the sparger. Yield of PAH obtained in bench and pilot scale fermentor was the same.

I - INTRODUÇÃO

A Bioengenharia tem entre suas atribuições a execução, a nível industrial, dos processos fermentativos e bioquímicos. A aplicação dos fenômenos de transporte, processos e operações unitárias, bem como outras disciplinas de engenharia, permite o estabelecimento de indústrias de Fermentação e Bioquímica.

O conhecimento científico e tecnológico neste setor acha-se pouco desenvolvido, com exceção das indústrias tradicionais, como a de fermentação alcoólica, fabricação de levedo e outros alimentos. As indústrias de fermentação, cujo produto final é um metabólito ou uma enzima, tem sido instaladas no Brasil importando-se não somente os equipamentos de produção, mas também o conhecimento tecnológico para operação das unidades. Daí a necessidade prioritária de concentrar esforços no ensino e desenvolvimento da pesquisa pura e aplicada, a fim de complementar os estudos bioquímicos e microbiológicos com a tecnologia para implantação de unidades de produção, no correspondente setor industrial.

Os efeitos desta dependência tecnológica tem sido evidentes no setor de produção de matérias primas para a Indústria Farmacêutica. Soma-se a esta dependência a perda de uma quantia importante de divisas por importações de produtos químicos.

Uma das matérias primas que tem recebido maior atenção é o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (58), produto básico para a fabricação de antibióticos semisintéticos (44). Estes são derivados da penicilina, sintetizados quimicamente a partir da molécula de 6-APA. Se diferenciam da penicilina G, biossintética, pela substituição do radical fenilacetilo por outros radicais. Isto lhes confere propriedades muito interessantes sob o ponto de vista terapêutico, tais como:

- maior espectro de ação e maior especificidade contra certos microrganismos.

- maior estabilidade frente à hidrólise do anel lactama devido a substituição do fenilacetilo por outros radicais mais protetores, permitindo que sejam ministrados oralmente.

O 6-APA é obtido pela hidrólise da ligação amídica das penicilinas biossintéticas G ou V, obtendo-se também como produtos de reação ácido fenilacético, quando se emprega penicilina G ou fenoxiacético, quando se emprega a penicilina V.

Atualmente, o método mais empregado para a obtenção de 6 APA é a hidrólise da penicilina G, feita em condições controladas pela enzima penicilinaamidohidrolase (E.C. 3.5.1.11.), inicialmente denominada penicilinaacilase ou penicilinaamidase. Esta enzima pode ser obtida de fontes (58) como células de rim e tecidos de plantas, porém a que apresenta interesse industrial é a síntese por microrganismos. Diversos fungos, leveduras e bactérias tem sido citados na literatura (25) como possuidores da atividade de penicilinaamidohidrolase no meio de fermentação ou nas células. A Escherichia coli é um destes microrganismos, tendo sido empregada industrialmente na produção da enzima. (16).

O presente trabalho foi desenvolvido exclusivamente com Escherichia coli e abrange especificamente o estudo da fermentação, para produção de células contendo a enzima. Este processo fermentativo foi analisado do ponto de vista da Bioengenharia, utilizando-se 3 escalas de fermentação: de laboratório, de banco e de planta piloto. Os resultados obtidos foram comparados com os modelos propostos por diversos autores dedicados a esse ramo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fermentação submersa de Escherichia Coli, para produção de penicilinamidahidrolase (PAH)

Huang e colaboradores (1960) (24) pesquisaram a atividade da enzima penicilinamidahidrolase (PAH) em espécies dos gêneros : Escherichia, Bordetella, Alcaligenes, Micrococcus, Pseudomonas e Nocardia.

Rolinson e colaboradores (1960) (45) distinguiram dois tipos de atividade enzimática: aquela apresentada por espécies de actinomicetos e fungos filamentosos, cujo resultado é uma hidrólise rápida da penicilina V e lenta da penicilina G e a manifestada por bactérias dos gêneros Escherichia e Alcaligenes, que hidrolizam rapidamente a penicilina G, porém é ineficiente sobre a penicilina V.

No gênero Escherichia, os autores demonstraram que a atividade enzimática encontra-se nas células e não no meio de cultura. Estabeleceram também que o pH ótimo de atividade da enzima estava entre 7,5-8,5 e a temperatura era de 42°C.

Levitov e colaboradores (1960) (29) estudaram o efeito estimulador à produção de enzima pela ação de indutores em células de E. coli, cultivadas em um meio de hidrolizado de proteínas. Obtiveram maior efeito estimulante com ácido fenilacético do que com o emprego de derivados deste, como a amida NN-n-propanolamida. Mostraram, ainda, que se obtém maior efeito estimulante quanto mais cedo for adicionado o indutor.

Gotovtseva e Levitov (1964) (20) estudaram, nas culturas de Bacillus faecalis alcaligenes NH15 e Escherichia coli N9637, a formação de PAH em relação às fontes de carbono e nitrogênio empregadas. Para E. coli, cultivada nos meios constituídos basicamente de água de maceração de milho, peptona e hidrolizado de caseína (en

zimático ou ácido), não foi encontrada a influência do triptofano ou outros derivados do indol sobre a produção de PAH até o nível de 0,5g/l de triptofano. Concentrações deste de 2,0g/l diminuíram a produção da enzima em 30-40%.

Com relação às fontes de carbono, foi observado que concentrações altas de glicose inibiam a produção da enzima e o ácido lático não apresentava nenhum efeito. Outros ácidos orgânicos, como o ácido pirúvico e o ácido acético, inibiam a síntese da enzima.

Szentirmai (1964) (54) estudou a formação de PAH em Escherichia coli Ny-I-3 e observou que a formação da enzima estava intimamente ligada ao efeito indutivo dos ácidos fenilacético ou fenoxiacético. As células de E. coli foram cultivadas em meio contendo água de maceração de milho, 20g/l e solução tampão de fosfato, 10g/l. A concentração de indutor adicionado foi de 0,01M/l, efetuando-se a fermentação durante 25 horas a 28°C.

Kaufmann e Bauer (1964) (27) mostraram que a produção de PAH por células de E. coli é máxima a 24°C, observando-se muito pouca enzima a 37°C. Estes autores relataram ainda o crescimento de E. coli em meio contendo sais inorgânicos, extrato de levedura e aminoácidos ou peptídeos. A faixa de pH adequada foi de 6,5-8,5 e a fermentação foi feita com aeração vigorosa.

Sikyta e Slezak (1964) (51) pesquisaram a fermentação contínua de E. coli para produção de PAH em um fermentador de 10 litros. O meio de cultura usado apresentava a seguinte composição: sólidos de água de maceração de milho, 9,0g/l, peptona, 10,0g/l, óleo de soja, 1% em volume. Na preparação, o pH do meio foi ajustado a 7,2 mediante adição de solução de hidróxido de sódio 40% e depois foi clarificado por ebulição durante 10 minutos, seguido de centrifugação. A temperatura de crescimento foi de 27-29°C.

O fermentador empregado tinha uma relação D/T=0,5^(*), sendo operado a 400 rpm de agitação e 0,3 vvm de aeração. A taxa de transferência de oxigênio do sistema correspondia a 670mM de O₂/lh,

* Consultar a nomenclatura

determinada pelo método do sulfito. O tempo de cultivo para alcançar o máximo de massa celular foi de 8 horas, com o valor de 3,0-3,5 g/l de células em base seca. A atividade enzimática aumentou até a quarta hora, mantendo-se constante até a oitava hora. A cultura descontínua requereu 0,15g/l de ácido fenilacético para estimular a formação da enzima, e a contínua 1,5g/l. Na fermentação contínua a taxa máxima de diluição foi de $0,5h^{-1}$.

Pruess e Johnson (1965) (43) estudaram a hidrólise enzimática da benzilpenicilina, marcada com enxofre S^{35} . Os autores descreveram a fermentação de Micrococcus roseus ATCC 9167 e Escherichia coli ATCC9637 para produção de enzima.

Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 500ml contendo 20% do seu volume em meio de cultura. Este era composto de infusão de coração (Difco), 25,0g/l; glicose, 40,0g/l; fosfato ácido de potássio, 9,5g/l; fosfato diácido de potássio, 6,0g/l. A glicose foi autoclavada separadamente em solução a 20%.

A linhagem de Escherichia coli foi cultivada durante 24 horas nesse meio, sendo suplementada com 1,5g/l de ácido fenilacético. Conseguiu-se uma densidade celular equivalente a 2,0g/l, em base seca.

Carrington e colaboradores (1967) (15) patentearam um processo para a produção de PAH, baseado na fermentação aeróbica de células de E. coli, na ausência de carboidratos fermentescíveis e com adição gradativa de fenilacetato de amônio, até uma concentração entre 1,2 e 20,0 g/l. Os autores descreveram uma fermentação com 600 litros de meio de cultura, composto de água de maceração de milho, 22,5g/l, a pH 6,5 e cultivado durante 22-28 horas a $24^{\circ}C$. A solução de fenilacetato de amônio foi adicionada gradativamente, de hora em hora, desde a 8^a até a 21^a hora de fermentação.

Cole (1969) (17) descreveu o processo de produção de células de E. coli contendo a enzima. As linhagens de E. coli NCIB 8743A e BRL 1360 foram cultivadas em tubos inclinados de agar-san-

gue (Oxoid CM55), 35g/l, a 27°C, durante 24 horas e foram em seguida conservadas a 5°C, até no máximo um mês.

O cultivo em frascos sob agitação foi feita em Erlenmeyer de 500 ml com 20% de meio de cultura. O meio empregado tinha a seguinte composição: extrato de levedura, 25,0g/l; ácido fenilacético, 0,8g/l e hidróxido de sódio em quantidade suficiente para atingir pH 7,0. Os frascos foram incubados durante 24 horas a 25°C, em agitador com um raio de giro de 0,032m e a 240 rpm.

A fermentação submersa foi feita em um fermentador de 100 litros com 50 litros de meio de cultura. A agitação foi de 430 rpm, para um agitador de 0,19m de diâmetro, com aeração de 0,4vvm. Operando à temperatura de 24°C, o tempo de fermentação foi de 19 horas. O meio de cultura era constituído de extrato de levedura, 25g/l, sendo adicionadas inicialmente 200 ppm de antiespumante, com posto de 20% de silicone RD em água.

O pH antes da esterilização foi 7,0. Durante a fermentação, adicionou-se antiespumante quando necessário, sendo que desde a 6ª até a 17ª foi feita a adição intermitente (de hora em hora) de ácido fenilacético, neutralizado com hidróxido de sódio. A concentração total de indutor foi de 1,5g/l, considerando-se a fermentação terminada quando atingiu o valor de pH 8,0.

Self e colaboradores (1969) (48) prepararam células de Escherichia coli ATCC 9637, contendo a enzima, seguindo o seguinte procedimento: a prefermentação foi feita em cultura que continha glutamato de sódio e ácido fenilacético. A fermentação submersa foi feita em 100 litros de meio de cultura, com a seguinte composição: glutamato de sódio, 5,0 g/l; sulfato de amônio, 1,0g/l; fosfato monoácido de potássio, 7,0 g/l; fosfato diácido de potássio 3,0 g/l; sulfato de magnésio hepta hidratado, 0,2g/l; ácido fenilacético, 2,0g/l. A fermentação foi conduzida em temperatura de 30°C, com agitação, atingindo-se o máximo de concentração intracelular de enzima em 8 a 10 horas.

Kleiner e Lopatnev (1972) (28) pesquisaram os efeitos da a

eração e agitação no cultivo de Escherichia coli ATCC 9637, para produção de PAH. A linhagem, conservada em tubos inclinados de agar-água de maceração de milho, foi cultivada em agitador de frascos rotatório, a 24°C, durante 18 horas. Foram empregados frascos Erlenmeyer de 750ml, com um volume de meio de cultura variável e tampões de algodão ou de gaze como meio para produzir diferentes taxas de aeração para uma intensidade de agitação fixa.

O meio de cultura empregado era composto de água de maceração de milho, 20,0g/l, em base seca e ácido fenilacético, 1,0g/l, sendo que o pH antes da esterilização era ajustado a 7,4-7,5.

Os autores concluíram que, para uma determinada intensidade de agitação, existe um valor ótimo da taxa de aeração com o qual se obtém o máximo na produção de enzima. Valores maiores ou menores deste parâmetro levaram a uma menor produção de enzima.

De outros experimentos, feitos em fermentador, estabeleceram que os melhores rendimentos na produção de enzima são obtidos a um nível baixo de concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Vojtisek e Slezak (1975) (59) estudaram a produção de PAH por Escherichia coli ATCC 9637. A técnica consistiu na cultura das células em um meio com a seguinte composição: fosfato diácido de potássio, 13,6g/l; sulfato de amônio, 2,0g/l; cloreto de cálcio, 0,08g/l; sulfato ferroso, 0,01g/l; hidróxido de sódio, 3,0g/l; sulfato de magnésio, 0,4g/l; D,L-lactato de sódio, 10g/l; fenilacetato de sódio, 1,0g/l. O pH permaneceu na faixa de 7,2-7,3.

No primeiro estágio, as células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500ml, com 20% de meio de cultura, empregando-se agitador de frascos rotatório, operando a 250 rpm. Este cultivo foi utilizado como semente da fermentação principal, feita em fermentador de 20 litros com 10 litros de meio de cultura, a 300rpm e 0,5 vvm de ar. A temperatura em ambos os estágios foi de 26°C. A fermentação principal durou 16 horas.

Posteriormente, os autores (60) pesquisaram o efeito de vários meios sintéticos na produção de enzima, empregando-se como única fonte de carbono e energia os seguintes sistemas: ácido fenila

cético, acetato e ácido fenilacético e lactato com ácido fenilacético. Os demais constituintes do meio foram os descritos no trabalho anterior, desses mesmos autores.

O estudo foi feito tomando como base de comparação um meio complexo, constituído de caldo nutriente (Difco), 8,0g/l e ácido fenilacético, 1,0g/l. Os melhores rendimentos foram obtidos nesta ordem: meio com fenilacético, meio com lactato, meio com acetato e meio complexo. Ficou estabelecido por esses autores que, com exceção do período inicial da fase exponencial, a síntese de enzima é proporcional à formação de massa celular. Na mudança da fase exponencial para o crescimento desacelerado, a formação de enzima decresceu rapidamente. Os autores observaram, ainda, que a concentração de oxigênio dissolvido influi na formação de enzima, sendo que níveis elevados de oxigênio dissolvido no meio de cultura reprimem a formação desta.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

Os ensaios foram conduzidos com Escherichia coli ATCC 9637, adquirida da American Type Culture Collection, 12301, Park lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA. O microrganismo, recebido na forma liofilizada, foi rehidratado em água estéril, em condições de assepsia. Esta suspensão foi em seguida inoculada em tubos inclinados com meio de agar nutriente-fenilacético e incubada, por período de quatro dias, a 30°C, sendo depois mantida a 7°C, repicando-se mensalmente. Todos os experimentos foram realizados partindo-se de tubos estoque de E. coli.

2. MEIOS DE CULTURA

Para manutenção da linhagem de E. coli, empregou-se agar-nutriente (Difco), suplementado com 0,4 g/l de fenilacetato de potássio (Apêndice, I p. 103).

Os meios de cultura empregados para prefermentação e fermentação tinham a mesma composição, variando somente a porcentagem dos componentes empregados. As formulações estão apresentadas no Apêndice I, p 103.

Os reagentes e ingredientes empregados nestas formulações foram:

- Glicose (PQ), como fonte de carbono e energia.
- Água de Maceração de Milho, como fonte de nitrogênio e carbono. Foi fornecida pela Refinações de Milho Brasil S.A., Usina de Mogi Guaçu, S.P. O produto é comercializado com teor médio de 50% de sólidos totais. Nos lotes recebidos, o conteúdo médio de nitrogênio era de 3,45%. Esta água de maceração de milho apresenta uma composição em aminoácidos descrita em (52).
- Fosfato de Potássio (K_3PO_4) (PQ), como fonte de potássio e fósforo e como neutralizante inicial da água de maceração de milho.
- Sulfato de Magnésio hepta hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (PQ), co

mo fonte de magnésio e enxofre.

- Microelementos. Os meios foram suplementados com os seguintes sais: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (todos de pureza química), até atingir a concentração de 10^{-5} M/l em Ca, Co, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo.

- Ácido Fenilacético (PQ), empregado em quantidades variáveis, como indutor da síntese da enzima. Nas prefermentações, o reagente foi incorporado ao meio de cultura e nos experimentos de produção foi incorporado parceladamente no decorrer da fermentação.

- Água. Os meios de cultura empregados nos experimentos de laboratório e escala banco foram preparados com água destilada. Naqueles feitos em escala piloto, foi adicionada água não tratada, proveniente de poços artesianos.

- Ácido Clorídrico e Hidróxido de Potássio. Estes dois reagentes foram empregados em concentração 5N, para controle do pH das fermentações. Nas escalas de laboratório e banco, os reagentes eram quimicamente puros. Na escala piloto, depois dos experimentos iniciais, o ácido clorídrico PQ foi substituído por produto comercial, o hidróxido de potássio PQ por hidróxido de sódio eletrolítico, em escamas, depois da comprovação de que o emprego destes não interferia na síntese da enzima.

- Agente antiespumante. Foi empregado FG10, da DOW CORNING, diluído a 10%, para controle da formação de espuma durante a fermentação.

Preparo do meio de cultura. Nos experimentos em escala de laboratório e banco, a água de maceração de milho empregada foi decantada por tempo suficientemente longo, que assegurasse a remoção dos sólidos suspensos. O meio de cultura final apresentou um conteúdo de sólidos suspensos menor que 0,1 g/l em base seca.

Nos experimentos em planta piloto, o meio de cultura foi previamente clarificado porque apresentava elevado teor de sólidos suspensos. Estes não afetavam a fermentação, porém interferiam na determinação da massa celular pelo método de secagem. Pa

ra a clarificação do meio, a água de maceração de milho foi diluída com água a 35% do volume final. Adicionou-se fosfato de potássio para a neutralização e a suspensão foi aquecida com vapor direto, mantendo-se a mesma por vinte minutos em ebulição. O tratamento foi feito em um tanque de aço inoxidável 316 com parede dupla, resfriando-se imediatamente o conteúdo até 35°C. Daí seguiram-se tres opções:

a) O meio foi completado com o resto dos constituintes e água, deixando-se decantar 24 horas a uma temperatura entre 0-5°C.

b) À suspensão foi adicionado 3,0 kg/m³ de Agente filtrante "Hyflo supercell", filtrando-se duas vezes em um filtro escala banco, de pratos horizontais revestidos de tecido de brim, com área filtrante de 0,15m² e com descarga centrífuga de sólidos, marca CHEMAP, modelo 012. A vazão foi de 0,25m³/m².h e a máxima pressão atingida de 1,5 Kg/cm². Depois, o meio de cultura foi completado com água e os outros constituintes.

c) Centrifugou-se o meio de cultura, já completado, empregando-se uma centrífuga escala banco α - LAVAL LAPX 202, montada com sistema de ejeção intermitente de sólidos, com frequência de 1 minuto e tempo de ejeção de 3 segundos. A centrífuga foi operada a 7000 g e a vazão de alimentação foi de 200 l/h.

3. EQUIPAMENTOS DE FERMENTAÇÃO

3.1 AGITADOR DE FRASCOS

Para o desenvolvimento das prefermentações, empregou-se um agitador de frascos rotatório, marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co. Inc., modelo G 27. A característica desse aparelho é a seguinte: raio de giro, 0,0254m; velocidade, variável entre 40 e 400 rpm; controle de temperatura da câmara, entre 0-60°C ± 0,5°C.

Técnica de Prefermentação. Dependendo do experimento em questão, as prefermentações foram feitas em :

a) Frascos Erlenmeyer de 500ml, contendo 50 ml do meio de

cultura, cultivado a 250 rpm e 30°C.

b) Frascos Erlenmeyer de 2000 ml, contendo 300 ml do meio de cultura. Os frascos possuíam defletores laterais, em disposição triangular. A cultura foi feita a 120 rpm e 30°C.

Esterilização. Os frascos com o meio de cultura, tampados com algodão não absorvente, foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para os frascos de 500 ml e 30 minutos para os 2000 ml.

Inoculação. Os frascos de 500ml foram semeados com uma alçada dos tubos estoque de E. coli ou com 2% do seu conteúdo da cultura, proveniente do frasco de prefermentação. Os de 2000 ml foram semeados sempre com 2% do seu volume com meio de cultura, proveniente do frasco de prefermentação de 500ml.

3.2 FERMENTADOR DE LABORATÓRIO

Foi utilizado um fermentador modelo MINI-FERM M-1000, da FERMENTATION DESIGN Inc. Esse aparelho possui as seguintes características:

- a) Dimensões do vaso, altura 0,18m; diâmetro 0,083m;
- b) Agitação, bastão magnético cilíndrico, comprimento 0,05m, diâmetro 0,01m, rotação variável entre 400 e 700 rpm.
- c) Aeração. O ar proveniente de um compressor foi passado por um filtro cerâmico para remoção de óleo e pó. A vazão foi determinada mediante um rotâmetro LAB-CREST, modelo CENTURY. O ar admitido no fermentador foi esterilizado, passando por um filtro de lã de vidro, com retenção de partículas de diâmetro igual ou maior a 0,5 μ .
- d) Controle de temperatura: foi feito por circulação contínua de água de resfriamento e uma resistência elétrica para o aquecimento, acionada por um termostato.
- e) Determinação da tensão de oxigênio dissolvido: foi efetuada com um eletrodo de oxigênio, da FERMENTATION DESIGN Inc., modelo E-100, do tipo galvânico, similar ao descrito por BORKOWSKI e JOHNSON (8). A leitura do eletrodo foi amplificada e transduzida em um analisador de oxigênio de igual procedência, modelo DOAR. Este aparelho possui um registrador acoplado com as

seguintes características: velocidade de avanço do papel registrador, 2,54cm/h; velocidade de impressão, 30 impressões/min.

O ajuste correspondente ao 0% (ausência de oxigênio no meio de cultura) foi efetuado com o fermentador sem aeração e agitação, imediatamente depois de autoclavado e ajustado na temperatura de operação, com precisão de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. O ajuste correspondente ao ponto 100% (saturação de oxigênio no meio de cultura) foi efetuado mantendo o fermentador nas condições de agitação e aeração correspondentes à experiência. A temperatura foi ajustada com uma precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

f) Controle de pH e controle do nível de espuma: ambos foram feitos manualmente, injetando os reagentes com seringas hipodérmicas, através de um diafragma de borracha de silicone. O pH foi determinado em amostras tiradas do fermentador.

Esterilização

O fermentador contendo o meio de cultura, o filtro de ar, as conexões e as seringas para injeção dos reagentes e inóculo e para tomada de amostras foram esterilizados em autoclave, durante 30 minutos a 121°C . A solução de antiespumante e a de ácido fenilacético foram esterilizadas por 15 minutos a 121°C .

Inoculação

O fermentador foi semeado em condições assépticas, por injeção de um inóculo correspondente a 2% do volume de meio de fermentação.

3.3 FERMENTADOR ESCALA BANCO

Foi utilizada uma unidade de fermentação CHEMAP, modelo F-0020. O fermentador tem uma capacidade total de 20 litros, sendo operado com 10 litros de meio de cultura. Todas as partes em contacto com o meio de fermentação e reagentes são construídas em aço inoxidável 316L.

a) Características geométricas do tanque. O tanque tem diâ

metro interno de $T=0,240\text{m}$, sendo suas dimensões e relações geométricas (apêndice II, p 105) as seguintes:

$D/T=0,322$; $H_T/T=2,03$; $H_L/T=1,0$; $H_1/T=0,288$; $H_2/T=0,625$; $H_A/T=0,083$; $W_D/T=0,0825$; $L/D=0,242$; $W/D=0,309$.

b) Sistema de agitação. O fermentador é montado com duas turbinas de disco de seis pás e quatro defletores. O eixo de agitação é montado no tanque mediante um selo "Crane" inferior e uma bucha superior de teflon grafitado. Os agitadores são acionados por um motor de corrente contínua, com controle eletrônico de velocidade, variável entre 100 e 1000 rpm.

c) Sistema de aeração. O ar é distribuído no fermentador mediante um anel com 15 orifícios, de 1,4mm de diâmetro, sendo esterilizado na entrada e saída do equipamento por filtros de porcelana porosa. A vazão foi determinada com um rotâmetro BROOKS, tipo 1355-10A-1BAB. A pressão do ar admitido ao sistema é controlada por uma válvula redutora de pressão.

d) Controle de temperatura. O elemento sensor é um termômetro de resistência de platina; o sistema de controle é com realimentação, marca HARTMANN-BRAUN, atuando sobre a admissão alternada de água de refrigeração e água aquecida por reostatos de imersão na camisa do tanque.

e) Controle de pH. O elemento sensor é um eletrodo de pH, combinado INGOLD, esterilizável, cuja leitura é amplificada por um amplificador de tensão METHROM HERISAU modelo E450, acoplado a um controlador eletrônico de pulso METHROM HERISAU, modelo E-470. O controlador opera duas bombas peristálticas HILOFLOW, da METERING PUMPS Ltd., de vazão ajustável, para dosagem de alcali ou ácido.

f) Controle de formação de espuma. O elemento sensor atua pelo princípio de variação da resistividade. O sinal amplificado aciona um sistema de tempos de dosagem e mistura do reagente, mediante uma bomba peristáltica HILOFLOW, da METERING PUMPS Ltd.

g) Medida da tensão de oxigênio dissolvido. Foi empre-

gado um eletrodo do tipo amperométrico, com membrana de polipropileno, da INSTRUMENTATION LABORATORY. A leitura foi amplificada por amplificador da mesma procedência.

h) Sistema registrador. Um registro multicanal HARTMANN-BRAUN registra os valores de temperatura, pH e tensão de oxigênio dissolvido. Características do registro: velocidade do papel = 2 cm/h; velocidade de impressão (por canal) = 2 impressões/minuto

Esterilização

A esterilização do fermentador, contendo o meio de cultura, foi feita por aquecimento com vapor saturado através da camisa e com agitação simultânea. O controle da temperatura de esterilização e da pressão do vapor de aquecimento foi manual.

Ciclo de esterilização.

O programa de esterilização seguido foi:

- aquecimento de $25-30^{\circ}\text{C}$ até 100°C : 24 minutos;
- eliminação de ar: 5 minutos ;
- aquecimento de 100°C até $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$: 14 minutos;
- tempo de aquecimento a 121°C : 21 minutos;
- resfriamento até 45°C : 16,5 minutos;
- agitação: 390 rpm.

Os filtros de ar, conexões de ar, saída de amostras, condutores de ácido, alcali, antiespumante e outros reagentes foram autoclavados a 121°C , por 30 minutos e conectados ao fermentador em condições assépticas.

Início de operação do fermentador

Após a esterilização do fermentador com o meio de cultura, foi feito o ajuste da tensão de oxigênio dissolvido a 0% (ausência de oxigênio), quando a temperatura do conjunto atingiu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir desse momento, foram conectados os acessórios, em condições assépticas e ligados os controles de temperatura, pH

e nível de espuma. Uma vez atingida a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram ajustadas as condições de máxima aeração e agitação. O meio de cultura foi saturado com oxigênio durante 10 minutos, calibrando-se para 100% a tensão de oxigênio dissolvido.

Inoculação

A semeadura do fermentador foi feita assépticamente com culturas em frascos agitados, introduzindo o conteúdo por meio de uma seringa hipodérmica. O volume de inóculo foi de 2% do volume de meio de cultura do fermentador.

3.4. FERMENTADOR PILOTO

Foi usada uma unidade de fermentação da FERMENTATION DESIGN Inc., modelo FD-250, operando com 150 ou 200 litros de meio.

a) Características do tanque. O tanque do fermentador é construído em aço inoxidável 316 e as linhas de admissão e descarga em aço inoxidável 304.

O diâmetro interno do fermentador é de $T=0,545\text{m}$ e as outras medidas e suas relações geométricas (ver apêndice II, p105) são as seguintes:

$D/T=0,396$; $H_T/T=1,98$; $H_L/T=1,23$ ou $1,62$; $H_1/T=0,217$; $H_2/T=0,593$; $H_A/T=0,092$; $w_b/T=0,0807$; $w/D=0,250$; $L/D=0,204$.

b) Sistema de agitação. O fermentador é montado com duas turbinas de disco, com 6 pás retas, acionadas por um motor de corrente contínua de velocidade variável (50-350rpm). A conexão do eixo ao fermentador é feita através de um selo-tipo "Crane", refrigerado com vapor.

c) Sistema de aeração. O ar é admitido na unidade através de uma válvula reguladora e redutora de pressão, passando por um rotâmetro BROOKS, modelo R-BM-24-4 e em seguida por um filtro com elemento filtrante de lã de vidro. Este filtro é aquecido

por uma camisa de vapor a $1,35\text{kg/cm}^2$, para a esterilização contínua do ar. O sistema de distribuição de ar é constituído por um anel com 20 orifícios de 2,2mm de diâmetro.

O ar que sai do fermentador passa por um filtro de esterilização igual ao já descrito e por uma válvula reguladora, para manter pressão positiva no fermentador.

d) Controle de temperatura. O elemento sensor é um termopar e o sistema de controle é com realimentação, da HONEYWELL, modelo ELETRONIC ONE ELEVEN. O mesmo possui um registrador acoplado, com uma velocidade de avanço do papel de 5cm/h.

O controle é feito por circulação forçada de água através da camisa do fermentador. O sistema de controle opera as válvulas solenoides de admissão de água de refrigeração e de vapor que se mistura diretamente à água.

e) Controle de pH. O elemento sensor é um eletrodo de pH, combinado INGOLD, esterilizável. O sistema amplificador e controlador é da FERMENTATION DESIGN Inc.. O controle é feito com realimentação, acionando uma bomba de diafragma para dosagem de alcali, marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, modelo SP-1 e uma bomba peristáltica para dosagem de ácido, HILOFLOW, da METERING PUMPS Ltd. A adição dos dois reagentes é programável mediante dois sistemas de tempo para ajuste dos tempos de adição e de mistura do reagente no fermentador. O amplificador fica conectado a um registro RUSTRAK, que marca o valor do pH com velocidade de deslocamento do papel de 2,54cm/h e 30 impressões/minuto.

f) Controle de formação de espuma. O elemento sensor opera pelo princípio de variação da resistividade. O sinal amplificado aciona uma bomba peristáltica da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co, que dosa o reagente.

g) Medida da tensão de oxigênio dissolvido. Foram empregados alternativamente o sistema de medida dos fermentadores de laboratório (galvânico) e do fermentador escala banco (amperométrico). A posição e colocação dos eletrodos está descrita no Apêndice II, p 105.

Esterilização

A esterilização do fermentador com o meio de cultura foi feita mediante um programa pré-estabelecido no controlador HONEYWELL, modelo ELETRONIC ONE ELEVEN. Uma vez escolhida a intensidade de agitação e o tempo de aquecimento a 121°C , o programa entra em execução. Iniciado o ciclo de esterilização, o programador bloqueia o sistema de controle de temperatura e simultaneamente fecha a válvula solenoide de admissão do ar. O fermentador é aquecido por meio de camisa com vapor a $1,35\text{Kg/cm}^2$, até atingir a temperatura de 100°C . Neste ponto, um sinal abre a solenoide de injeção de vapor direto através do aspersor, para eliminar o ar contido no sistema. Após esta eliminação, fecha-se totalmente a válvula reguladora de pressão da saída do ar. A partir deste momento, o aquecimento prossegue até atingir a temperatura de 121°C . Então, o programador fecha a solenoide do circuito de injeção de vapor e opera o sistema de controle de temperatura, para manter a mesma constante abrindo e fechando a solenoide de admissão de vapor na camisa do fermentador.

Todas as linhas de adição de reagentes, sementeira, tiragem de amostra e descarga são esterilizados manualmente com injeção de vapor direto, depois que o fermentador atingiu a temperatura de 121°C .

Concluído este tratamento térmico, o controle fecha a solenoide de entrada de vapor e abre a solenoide de admissão de água de refrigeração na camisa. Quando o meio de cultura atinge a temperatura de 5°C acima do valor pré-estabelecido para a fermentação, o programador liga novamente o controle de temperatura.

Ciclo de esterilização

O programa de esterilização seguido foi:

agitação: 120 rpm;

aquecimento de 30 a 100°C : 29 minutos;

eliminação de ar: 5 minutos;

aquecimento de 100 a 121°C : 16 minutos;

tempo de aquecimento a 121°C : 15 minutos

resfriamento até 40°C : 50 minutos.

As conexões do fermentador, tubos de admissão de reagentes, inóculo, diafragmas das bombas e os recipientes vazios de ácido clorídrico, hidróxido de sódio e os recipientes contendo anti-espumante e ácido fenilacético foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos e conectados ao fermentador em condições assépticas.

Início de operação

O procedimento para calibração do eletrodo de oxigênio foi similar ao descrito em 3.2 e 3.3. Uma vez conectadas as linhas de sementeira, adição de neutralizantes e antiespumante, a pressão interna do tanque foi ajustada a aproximadamente $0,1\text{Kg/cm}^2$.

Os sistemas de controle de pH e nível de espuma foram ligados a partir do momento em que foi atingida a temperatura de operação. O fermentador estava pronto para ser inoculado.

O conteúdo dos Erlenmeyer de prefermentação, equivalente a 2% do volume do meio no fermentador, foi acumulado em um tanque estéril e inoculado no fermentador mediante uma bomba peristáltica SIGMAMOTOR Inc., modelo TM-35-100.

4. BANCO DE AGITADORES

Para calcular a potência consumida nos fermentadores sem aeração, foi empregado um banco de teste de agitadores modelo ELB da BENCH SCALE EQUIPMENT CO.

A unidade é constituída por um motor de velocidade variável mediante transmissão de engrenagens, da GRAHAM TRANSMISSIONS INC., montado sobre um rolamento e conectado por um braço de 0,127 ou 0,254 m a um dinamômetro HAMETEX da HUNTER SPRING (precisão 0,01 libra-força).

Nas determinações da potência para as características geométricas do fermentador banco, foi empregado um tanque cilíndrico de vidro com 0,345 m de diâmetro interno. Para as correspondentes ao fermentador piloto o diâmetro do tanque foi de 0,212 m.

Para as determinações foram construídas turbinas de disco, réplica das empregadas no fermentador banco e piloto. As mesmas foram construídas em lâmina de latão e corpo de bronze pela Oficina de Manutenção da FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS e AGRÍCOLA DA UNICAMP.

5. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.

Para este estudo foi empregado um viscosímetro rotacional de cilindros concêntricos EPPRECHET RHEOMAT 15 da CONTRAVES AG e um banho de termostatização MAGNI WHIRL da BLUE M ELECTRONIC CO.

As determinações dos parâmetros reológicos foram feitas sobre:

- meio de cultura esterilizado.
- meio de fermentação contendo as células a diversas densidades de massa celular.
- meio de fermentação onde as células foram retiradas através de um filtro SARTORIUS, empregando-se membrana de 0,45 μ .

As amostras do meio de fermentação foram tratadas imedia

tamente com 10 ppm de cloreto de mercúrio para morte das células e guardadas em geladeira até o momento do seu uso.

As determinações foram feitas a 30°. Uma vez que as amostras atingiram uma temperatura próxima deste valor foram deaeradas a uma pressão de 6,5 mm de Hg em uma bomba de vácuo LEYBOLD HERAUS modelo S12.

As culturas eram provenientes de frascos agitados e de fermentador de laboratório.

6. EQUIPAMENTOS COMPLEMENTARES

Além dos materiais comumente usados em laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- a - Espectrofotômetro BAUSCH and LOMB, modelo SPECTRONIC 20.
- b - Medidor de pH METROHM HERISAU, modelo E516.
- c - Balança analítica METTLER H20T (max 160g, div. 0,01mg).
- d - Balanças de precisão METTLER:
 - modelo P160N (max. 160g, div 1mg)
 - modelo P1210N (max 1200g, div 10mg).
 - modelo P3N (max 3000g, div 1g).
- e - Balanças:
 - DAYTON HOBART (max 10Kg, div 10g).
 - HOWE RICHARDSON, modelo 5401-XL-SB1 (max 500, div 0,2Kg)
- f - Autoclave LUFERCO, modelo: autoclave horizontal - 39, 209 R (pressão máxima 3Kg/cm²).
- g - Autoclave ELECTRIC STEROCLOVE, modelo 25X (pressão máxima 2Kg/cm²)
- h - Estufa de secagem e esterilização FANEM, modelo 315/5.
- i - Estufa de secagem a vácuo FANEM, modelo 099/A-1 (máxima temperatura 200°C, máximo vácuo 686mm de Hg).
- j - Bomba de vácuo WELCH da SARGENT SCIENTIFIC Co., modelo 1399 (máximo vácuo 686mm de Hg).
- k - Centrífuga FANEM, modelo EXCELSA 3 (max 5000 r.p.m.).
- l - Centrífuga SORVALL, da IVAN SORVALL Inc., refrigerada, modelo Superspeed RC2-B

7. TÉCNICAS DE ANÁLISE EMPREGADAS

7.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR.

Para controle de crescimento celular, foi determinada a massa seca de sólidos em suspensão no meio de fermentação. A técnica adotada foi a seguinte: uma alíquota de 40ml do meio de fermentação foi centrifugada a 4000 rpm (65 g), durante 10 minutos. O precipitado foi separado e os sólidos resuspenso no mesmo volume de água, centrifugando-se novamente a 4000 rpm, por 10 minutos. Depois de separado o sobrenadante, o precipitado dos tubos foi seco em estufa a vácuo, a temperatura de 50-60°C, por um período de 24 horas.

O método foi previamente testado, determinando-se o tempo mínimo de secagem, para concentrações de células entre 1-10g/l, sendo atingido peso constante com 15 horas de secagem.

Foi testada também, para densidade celular entre 1 e 10g/l, a reproducibilidade dos resultados, repetindo-se seis vezes o ensaio para cada amostra. Considerando uma distribuição normal do erro padrão através de todos os lotes de 3 amostras, o valor médio obtido foi de 0,099g/l, com um erro padrão de 0,089, para 15 experimentos.

7.2. DETERMINAÇÃO DOS CARBOHIDRATOS REDUTORES.

Os carboidratos redutores foram determinados espectrofotometricamente com o reagente "Antrona", segundo uma modificação (22) do método original de Morris.

As amostras do meio de fermentação foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 10 minutos. Uma alíquota de cada sobrenadante foi diluída convenientemente e 2ml desta foram então misturadas com 8ml do reagente Antrona, deixando-se em banho-maria por 10 minutos. Essas amostras foram resfriadas rapidamente e a absorbância da solução foi lida a 630nm, no espectrofotômetro.

A concentração de carboidratos foi calculada a partir

de uma curva padrão feita com glicose (Apêndice III, p.108). Os reagentes empregados foram Antrona (PQ), ácido sulfúrico e glicose (PA).

7.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PENICILINAMIDAHIDROLASE (PAH) NAS CÉLULAS.

A determinação da atividade enzimática nas células de E. coli foi efetuada seguindo uma adaptação do método descrito por Saccani e Pitrolo (47). Este método baseia-se na reação de adição nucleofílica entre o ácido 6-aminopenicilânico com o paradimetilaminobenzaldeído, para formar uma imina.

A técnica experimental seguida foi a seguinte: amostras de 40ml de meio de fermentação foram centrifugadas a 10000rpm, (425g), por 10 minutos, à temperatura de 7°C. O sedimento contendo as células foi resuspenso no mesmo tubo com 10ml de solução tampão de fosfato (pH 7,6) com 20g/l de benzilpenicilina. À suspensão adicionou-se 0,02ml de tolueno e os tubos foram agitados a 250rpm, durante 4 horas, mantendo-se os mesmos a temperatura de 30°C. Depois da reação enzimática, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm, durante 5 minutos. Deste centrifugado, tomou-se uma alíquota (dependendo da quantidade de 6-APA formado) em um tubo de ensaio e o volume foi levado a 2ml, com água destilada. Ao tubo adicionou-se 5ml de uma solução de ácido acético 10% em metanol. A solução foi homogeneizada por agitação e filtrada com papel SCHLEIGHER and SCHÜLL N°589-1. Ao filtrado, límpido, adicionou-se 1 ml de solução contendo 0,5g de paradimetilaminobenzaldeído e 0,01g de hidroquinona em 100 ml de álcool etílico 96°GL.

Após 10 minutos de reação, a absorbância da solução foi determinada a 410nm, no espectrofotômetro, obtendo-se a concentração de 6-APA na amostra mediante uma curva padrão (Apêndice III, p.107).

A atividade enzimática foi expressa como unidades de enzima por ml de meio de cultura (UE/ml). A unidade de enzima foi definida como o número de micromoles de 6-APA formado por hora,

nas condições descritas experimentalmente.

Os reagentes empregados foram de pureza analítica , com exceção do paradimetilaminobenzaldeído (PQ) e da penicilina potássica comercial, 99,45%, com potência iodométrica de 1594 U/mg , fornecida pelo SQUIBB INDÚSTRIA QUÍMICA, SA.

A amostra de ácido 6-aminopenicilânico foi cedida pelos LABORATÓRIOS NEOMED S.A..

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTUDO EM FERMENTADOR DE LABORATÓRIO

Os resultados dos experimentos feitos em escala de laboratório estão apresentados no Quadro I, p. 57.

As fermentações foram desenvolvidas empregando-se o meio de cultura mais recomendado pela bibliografia. Este se baseia no emprego de água de maceração de milho como única fonte de nitrogênio e ácido fenilacético numa concentração de 1,0 g/l.

A temperatura de fermentação foi de 30°C e o pH foi mantido a 7,0.

Em todos os experimentos procurou-se manter um valor da tensão de oxigênio dissolvido (TOD), fixado previamente, variando-se a aeração entre 0 e 2 v.v.m e a agitação entre 500 e 700 rpm, para corrigir os afastamentos da faixa de tensão de oxigênio dissolvido programada. Como valor de tensão de oxigênio dissolvido durante o ensaio, tomou-se a média de todos os valores registrados em intervalos de 15 em 15 minutos, a partir do momento em que se formava uma concentração apreciável de células no fermentador.

Ciclo de Fermentação.

Depois da 5ª hora de fermentação, o pH do meio começava a se deslocar para valores menores que 7,0, sendo necessária a correção do mesmo. O ajuste foi feito com KOH 5N. Após certo tempo, este período de formação de ácidos era seguido de outro que se caracterizava pelo deslocamento do pH à faixa alcalina, corrigindo-se então com HCl 5N. Durante este segundo período ocorria, também, a formação de grande quantidade de espuma requerendo-se a adição de anti-espumante para controlar a fermentação.

A adição de ácido fenilacético foi gradativa, sendo feita em quantidades de 0,2 g/l a cada hora.

Concentração de Oxigênio Dissolvido no Meio de Fermentação

O estudo foi feito procurando-se estabelecer dados referentes à tensão de oxigênio dissolvido no meio de fermentação mais convenientes para obtenção de PAH.

De acordo com a literatura, a respeito da fermentação com E. coli, tinha-se informação de Kaufmann e Bauer (27) que recomendavam desenvolver a fermentação com aeração intensa e um estudo mais recente de Kleiner e Lopatnev (28) que indicava manter a níveis baixos a concentração de oxigênio dissolvido.

Por outro lado, Gray e colaboradores (21), estudando a produção de outra intraenzima, a β -galactosidase de E. coli e Acevedo e Cooney (2), pesquisando a produção de PAH extracelular proveniente de Bacillus megaterium, recomendavam manter elevada a concentração de oxigênio dissolvido para obtenção de melhores rendimentos.

O estudo feito neste trabalho orientou-se para a realização de experimentos à diferentes níveis de tensão de oxigênio dissolvido. Os resultados experimentais obtidos demonstraram que a quantidade de PAH obtida em UE (unidade de enzima) por unidade de massa celular (em base seca) é maior quanto menor for a tensão de oxigênio dissolvido. Quando a concentração de oxigênio dissolvido for muito elevada, consegue-se apenas detectar qualitativamente a presença da enzima. Os resultados deste estudo forneceram um critério para projetar as fermentações a maior escala. De acordo com este deve proceder-se segundo as recomendações de Kleiner e Lopatnev.

Posteriormente a este estudo em escala de laboratório, um trabalho publicado por Vojtisek e Slezak (60) confirma os dados obtidos referentes à conveniência de manter uma baixa concentração de oxigênio dissolvido.

Os rendimentos em enzima deste conjunto inicial de experimentos foram baixos, porém os tempos de fermentação foram breves (12 - 17 horas), existindo ainda outras variáveis que não foram consideradas.

2. ESTUDO EM FERMENTADOR BANCO

Os experimentos em fermentador banco encontram-se descritos no Quadro II, p. 58, figuras 1 a 2, p. 69 a 70 e nas tabelas das p. 90 e 91.

As fermentações foram planejadas com base nos resultados obtidos nos experimentos de laboratório. Empregou-se o meio de cultura nº 3, mantendo-se o pH a 7,0 e a temperatura a 30°C. A pré fermentação foi efetuada no meio nº 2, durante 10 horas.

A intensidade da agitação foi mantida fixa durante as fermentações, modificando-se gradualmente a taxa de aeração, para manter a tensão de oxigênio dissolvido sob controle.

Adicionou-se fenilacetato de potássio gradativamente a partir da 2ª hora de fermentação:

Ciclo de Fermentação

De uma análise feita da mudança da tensão de oxigênio em função do tempo, observada nos estágios iniciais do experimento 10/1, verificou-se que a fermentação apresentava uma fase de adaptação relativamente breve. A partir desse período o microrganismo começava a crescer com cinética exponencial. O começo da fase (1,0 hora) foi determinado a partir da representação gráfica do logarítimo da diferença da tensão de oxigênio dissolvido de saturação e a tensão de oxigênio dissolvido (TOD) no meio da fermentação versus o tempo. Do gráfico da figura 2, p. 70 foi extrapolado o começo da fase. Esta relação foi deduzida combinando-se as equações que expressam a taxa de demanda de oxigênio das células (TDO) e a Taxa de Transferência de Oxigênio ao meio de fermentação (TTO). Para o período de análise, foram mantidas fixas as intensidades de agitação e a taxa de aeração e o coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_1a) podia ser considerados constante.

A combinação das equações

$$TTO = k_1 a B (100 - TOD)$$

$$TDO = q_1 x = q_1 x_0 \exp. [\mu t]$$

onde: B = constante

q_1 = demanda específica de oxigênio das células
(mm de Ox./g de célula)

$$\text{levam à equação: } \ln (100 - TOD) = \ln \left[\frac{q_1 x_0}{k_1 a \cdot B} \right] + \mu t$$

O valor da tangente correspondente a μ é maior que o valor de μ obtido nas determinações da cinética de crescimento. Isto significa que inicialmente o oxigênio não é utilizado somente na produção de células, mas também em alguma outra reação enzimática paralela. O consumo de glicose também segue um modelo exponencial, porém com μ distinto ao da multiplicação celular. (figura 2, p. 70)

Cinética da Multiplicação Celular

Considerando-se os dois experimentos realizados, o primeiro fato interessante a analisar é a constatação de dois períodos cinéticos (ver figura 1, p. 69). No primeiro período, a fermentação transcorre com crescimento exponencial e a velocidade específica de crescimento (μ_I) atinge valores elevados. No caso da fermentação 10/1, determinou-se um valor de $0,457 \text{ h}^{-1}$. Este valor parece ser o máximo que se pode atingir, sem limitação de nutrientes, a 30°C , nas condições estudadas. O valor obtido coincide com aquele de μ_{max} ($0,46 \text{ h}^{-1}$), apresentado por Bauer e Shiloach (6), que determinaram a máxima velocidade específica de crescimento em fermentadores de laboratório, sem limitação de oxigênio nem outros nutrientes, porém em um meio de cultura diferente. Sikyta (51), na fermentação contínua de *E. coli* para obtenção de PAH, chegou a um valor de $0,5 \text{ h}^{-1}$, empregando um meio de cultura similar ao empregado nestes estudos.

A análise de regressão feita indica que o segundo período

também é governado por uma cinética exponencial, onde a velocidade específica, μ_{II} , atinge valores muito menores que μ_I . No experimento 10/1, μ_{II} foi de $0,0652 \text{ h}^{-1}$. Mediante a intersecção das duas equações cinéticas determinou-se que a mudança ocorre às 6,91 horas. O mesmo fenômeno foi observado no experimento 10/2, porém com menor duração para ambos períodos.

Analisando a mudança na concentração de carboidratos, verificou-se que a mesma caiu rapidamente até atingir um valor constante ($\sim 3,60 \text{ g/l}$) às 5,25 horas. De acordo com este resultado, a glicose contida no meio de cultura havia se esgotado após esse tempo, restando somente a porção de carboidratos, proveniente da água de maceração de milho, que reage no ensaio da Antrona, porém não é utilizada pelo microorganismo.

Desde que o esgotamento dos carboidratos assimiláveis foi bem anterior à mudança cinética, esta é provocada pela limitação de oxigênio. O fato de Sikyta ter obtido um valor de μ similar ao obtido neste trabalho, no seu estudo feito em um meio empregando água de maceração de milho e peptona, sem adição de glicose, confirma que é a queda da concentração de oxigênio dissolvido e não o esgotamento da glicose a responsável pela mudança da cinética.

De acordo com Bauer e Shiloach, o E. coli tem comportamento semelhante a outros microorganismos não estritamente aeróbios, ou seja, responde a limitação de oxigênio com uma continuação do crescimento com cinética exponencial, porém com velocidade específica menor. Hospodka (23), estudando o controle da fermentação de Saccharomyces cerevisiae por limitação de nutrientes, verificou a diminuição de μ quando a concentração de O_2 dissolvido caía abaixo do valor crítico.

Gray e colaboradores (21), observaram este fenômeno no seu estudo da cinética da biosíntese da β -galactosidase por E. coli. A interpretação dos resultados feita por eles indica que a resposta a limitação de oxigênio é uma sucessão decrescente de valores de μ .

A interpretação dos resultados, considerando-se a existên

cia de dois períodos cinéticos exponenciais, concorda com o estudo feito para o Lactobacillus delbrückii, por Tsao e Hanson (56). Estes autores indicaram a aparição de duas ou mais cinéticas exponenciais com μ decrescente, sendo que a mudança de uma a outra era provocada pelo esgotamento de um nutriente do meio de cultura e a continuação do crescimento era devido ao emprego de outro nutriente de mais difícil assimilação. No trabalho descrito, esses autores apresentaram um modelo matemático para descrever o comportamento do sistema; baseado na cinética de Monod.

Tsao e Hanson classificam os nutrientes em essenciais e estimulantes do crescimento.

O esgotamento de um nutriente essencial provoca a cessação do crescimento e o de um nutriente estimulante reduz a velocidade específica de crescimento.

A equação que apresentam é a seguinte:

$$\frac{dx}{dt} = \left[\mu + \frac{k_1 S_1}{K_1 + S_1} + \dots + \frac{k_n S_n}{K_n + S_n} \right] \left[\frac{E_1}{K_{E1} + E_1} \dots \frac{E_m}{K_{Em} + E_m} \right] X$$

onde:

μ : máxima velocidade específica de crescimento em ausência de nutrientes estimulantes.

$k_1 \dots k_n, K_1 \dots K_n, K_{E1} \dots K_{Em}$: constantes da equação de Michaelis - Menten.

$S_1 \dots S_n$: nutrientes estimulantes.

$E_1 \dots E_n$: nutrientes essenciais

Este modelo pode ser empregado para explicar a mudança cinética provocada pela limitação de oxigênio neste trabalho. A equação proposta é a seguinte:

$$\frac{dx}{dt} = \left[\frac{\mu' (O_x - O_{xI})}{K_I + (O_x - O_{xI})} + \frac{\mu_{II} (O_x - O_{xII})}{K_{II} + (O_x - O_{xII})} \right] \left[\frac{E_1}{K_{E1} + E_1} \dots \frac{E_m}{K_{Em} + E_m} \right] X$$

onde :

O_x : concentração de oxigênio dissolvido.

O_{xI} : concentração de oxigênio dissolvido na qual se produz a mudança no metabolismo.

O_{xII} : concentração de oxigênio limite para crescimento celular.

μ' : valor máximo da contribuição à velocidade específica de crescimento provocada pelo oxigênio no primeiro período.

μ_{II} : máxima velocidade específica de crescimento no segundo período cinético.

K_I , K_{II} : constantes da equação de Michaelis - Menten

Analisando a equação temos:

a) quando $O_x \geq O_x$ crítico, a velocidade específica de crescimento é $\mu_I = \mu' + \mu_{II}$.

b) quando O_x diminui abaixo do valor crítico, μ cai rapidamente até atingir o valor constante de μ_{II} , quando $O_x = O_{xI}$.

c) A velocidade específica de crescimento se mantém em μ_{II} , até que O_x se aproxime o suficiente a O_{xII} e começa um rápido período de diminuição de μ .

d) quando $O_x = O_{xII}$ cessa o crescimento celular.

Com respeito ao experimento 10/2, obteve-se a mesma sequência de cinéticas que para 10/1, porém μ_I e μ_{II} são menores.

Novamente foi observado o ciclo inicial de formação de compostos ácidos, possivelmente resultantes do metabolismo da glicose. Para o experimento 10/1 o ciclo começa após 2,5 horas de fermentação, durando até as 9,5 horas. O consumo de neutralizante não é uniforme, ou seja, inicialmente é maior e vai decrescendo em intensidade, a medida que transcorre o tempo. Este ciclo é seguido de outro de alcalinização do meio de fermentação, requerendo-se a adição de HCl para a neutralização, a partir da 11^a hora de fermentação e até a 16^a hora.

Taxa de Transferência de Oxigênio

A fermentação que procedeu com maior aeração (10/1) foi a que produziu uma concentração mais elevada de massa celular.

Isto pode ser demonstrado se o equilíbrio entre a TTO e a TDO são representadas respectivamente pelas equações (46):

$$TTO = k_1 a (O_x^* - O_x)$$

$$TDO = q_I x_I = q_{II} x_{II}$$

$$TTO = TDO$$

$$TDO \leq (TTO)_{\max.}$$

onde:

$k_1 a$: coeficiente volumétrico de transferência de massa ,
representado por uma correlação do tipo $k_1 a = J(E)^m (Vs)^n$, em unidades de s^{-1} -

E : potência unitária em m^2/s^3 .

Vs : velocidade de aeração em m/s.

J : parâmetro de dimensões $s^{(3m + n - 1)} m^{-(2m + n)}$

q_I e q_{II} : demanda específica de oxigênio no primeiro e segundo períodos cinéticos respectivamente (mM de O_2/g de célula)

x_I e x_{II} : densidades de massa celular atingidas no primeiro e segundo períodos respectivamente.

De acôrdo com estas relações, a maior velocidade de aeração superficial imposta no experimento 10/1 provocou um aumento em $k_1 a$ e na $(TTO)_{\max.}$, o que permite incrementar a massa celular total formada no experimento 10/1 com relação ao 10/2.

Biossíntese da Enzima

Os resultados mostraram que a enzima somente era sintetizada em quantidade apreciável no segundo período cinético. Em ambos os experimentos, a enzima era apenas detectável qualitativa -

mente à 6ª hora. No experimento que se formou mais massa celular, verificou-se também maior rendimento de enzima. Estes rendimentos superaram amplamente aqueles obtidos em laboratório. (Quadro I e II). Uma das causas pode ser atribuída à tensão de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Estas fermentações procederam com limitação de oxigênio e isto favoreceu a produção de enzima.

As condições de agitação neste fermentador também podem ter sido responsáveis pelo aumento da quantidade de enzima.

3. ESTUDO EM FERMENTADOR PILOTO

Prosseguiu-se em fermentador piloto os estudos desenvolvidos em escala de laboratório e banco. Os resultados desse estudo são escritos e discutidos a seguir. O quadro III, p. 59 mostra um resumo do mesmo e também os parâmetros cinéticos, calculados mediante análise de regressão, a partir dos dados experimentais. Nas figuras 3 a 15, p. 71 a 83 são apresentadas as representações gráficas, em eixos logarítmicos-normais, da cinética da fermentação.

Ciclo de Fermentação

As fermentações foram feitas à temperatura de 30°C e pH 7,0. Empregou-se o meio de cultura baseado em água de maceração de milho, no qual variou-se somente a concentração de glicose em alguns experimentos e em outros eliminou-se totalmente este componente. As modificações no conteúdo de carboidratos não modificaram porém o ciclo de fermentação. Este último foi em tudo análogo ao observado nos experimentos em escala banco. Repetiu-se o primeiro período de deslocamento do pH a valores menores que 7,0, requerendo-se o emprego de NaOH neutralizante.

A frequência de consumo de neutralizante começava aumentar até atingir um valor máximo, a partir do qual diminuía paulatinamente. Depois de um período de estabilidade de pH, iniciava-se o ciclo de alcalinização do meio, sendo necessária a adição de HCl para neutralização. Este segundo período apresentava também um máximo.

O reagente anti-espumante era consumido, em sua maior parte, durante o ciclo de alcalinização do meio.

A adição de ácido fenilacético foi sempre de 1,0 g/l efetuada em etapas de 0,2 g/l, hora a hora. Neste conjunto de experimentos variou-se o tempo de começo de adição de fenilacético para estudar seu efeito na produção de PAH.

Cinética da Multiplicação Celular

Foi confirmada a existência de dois períodos cinéticos, observados anteriormente na escala banco. Os parâmetros das equações que descrevem a cinética no primeiro e segundo períodos e as coordenadas desta mudança foram calculados mediante análise de regressão. Os resultados são apresentados no Quadro III, p. 59 e as curvas em gráficos nas figuras 3 a 15.

A independência da mudança cinética com respeito a presença de glicose no meio de cultura ficou novamente confirmada, uma vez que os experimentos realizados com o meio de cultura com menor teor de glicose e aqueles feitos com o meio sem glicose apresentaram também os dois períodos.

A respeito do valor de μ_{II} , o mesmo apresenta uma ampla faixa de variação ($0,0137 - 0,134 \text{ h}^{-1}$). Os dois valores mais frequentes estão na ordem de 0,035 e 0,060 aproximadamente. O porque da variação nos valores de μ_{II} não pode ser explicado, pois não foram programados estudos para pesquisar a variação deste parâmetro, as variáveis das quais depende e o controle do mesmo. Porém, é de se notar que os experimentos 150/4 e 5, em que o cultivo foi submetido a um programa de aeração similar e a intensidade de agitação foi mantida constante, obteve-se os mesmos valores de μ_{II} para ambos os experimentos.

O valor de μ_I também sofreu variação. Nos experimentos em que foi calculado, o intervalo de valores foi de (0,176-0,375), portanto menores que μ_{max} .

Considera-se a hipótese que os valores de μ_I e μ_{II} estejam relacionados com a intensidade da turbulência no meio de fermentação. Na faixa de agitação e aeração em que foram operados os dois fermentadores, tanto a intensidade de agitação como a velocidade de aeração apresentaram marcada influência sobre a turbulência local (50).

Por outro lado, o programa de aumento gradual da TTO em função do tempo, mantendo-se a TDO em valores baixos, permitiu o controle da duração de ambos períodos cinéticos. Nos experimentos 150/6,7 e 14 conseguiu-se praticamente eliminar o primeiro período cinético. Nos experimentos 150/9,10,11 e 15, procedendo do mesmo modo, conseguiu-se produzir a maior parte da massa celular

(65% em média) no segundo período. Porém, nos experimentos 150/4, 5, 8, 13, em que se deixou atingir o valor máximo da TTO em poucas horas, foi produzida 58% em média da massa celular no primeiro período cinético

O aumento gradual na TTO foi feito variando-se somente a taxa de aeração, ou essa mesma taxa e a intensidade de agitação simultaneamente.

A figura 16, p. 84, apresenta a função $\frac{TTO}{(TTO)_{120rpm}} = \phi(t)$
1 v.v.m

para os experimentos 150/4, 5 e 13, em que a produção de massa celular no primeiro período cinético predominou frente aos 150/6, 7 e 14 em que praticamente este não existiu. Nesta figura representa-se o produto $\frac{N^{1.98} v.v.m^{0.66}}{120^{1.98} v.v.m^{0.66}}$ que é proporcional a $\frac{TTO}{(TTO)_{120rpm}}$
1 vvm.

quando são desprezadas as variações na tensão superficial do meio.

Máxima Massa Celular Formada

Nos experimentos feitos com uma intensidade de agitação máxima de 120 rpm, a massa celular final dependeu da máxima taxa de aeração, logo da $(TTO)_{max}$. para cada experimento.

A massa celular obtida no experimento em que a aeração atingiu 2,0 vvm foi de 9,45 g/l, sendo que os valores médios para aqueles feitos a 1,5 e 1,0 vvm foram de 7,55 e 5,40 g/l respectivamente.

Novamente é comprovado uma interrelação entre a massa celular final atingida e a $(TTO)_{max}$. no fermentador.

Biossíntese da Enzima

Verificou-se que nos experimentos realizados em fermentador piloto, abiossíntese de PAH somente se produz em grau apreciável a partir do segundo período cinético e uma vez adicionado o indutor. Naqueles experimentos em que o indutor foi adicionado a partir da 2ª hora de fermentação, não foi detectada a presença de

enzima até após o começo, representado graficamente na figura 17 , p. 85. Nos experimentos nos quais o fenilacético foi adicionado depois que o segundo período achava-se bem avançado, não foi produzida a enzima até a adição deste (experimentos 150/14 e 15).

O acúmulo da enzima segue uma cinética exponencial como se pode verificar pelos tres experimentos citados, através da representação gráfica do logarítmo neperiano da atividade enzimática em UE/ml versus o tempo (figura 17).

Abiossíntese está associada com a multiplicação celular : quando esta cessa, a formação de enzima cai rapidamente até se deter (Exp. 150/14) ou finaliza de imediato (experimento 150/15).

Os resultados obtidos indicam concordância com os publicados por Vojtisek e Slezak (60).

4. MODELO MATEMÁTICO PARA DESCREVER A PRODUÇÃO DE PAH

Com base nos resultados obtidos nos fermentadores banco e piloto, foi proposto um modelo matemático para descrever a produção de PAH por E. coli. O modelo proposto tem validade para o meio de cultura e as condições de cultura e hidrodinâmicas estabelecidas nos fermentadores banco e piloto.

Nesse modelo foi considerada a TTO dada pela equação:

$$TTO = k_1 a (O_x^* - O_x), \text{ sendo}$$

$$K_1 a = J (E)^m (Vs)^n, \text{ onde:}$$

$K_1 a$ = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (s^{-1}).

E = potência unitária (m^2/s^3), sem ar.

Vs = velocidade do ar referida à secção transversal do fermentador (m/s).

J = parâmetro dado em $(m^2/s^3)^{-m} (m/s)^{-n} (s^{-1})$

O parâmetro J depende das propriedades do sistema microrganismo-meio de cultura. Neste caso o sistema se comporta como um fluido dilatante com um índice de consistência de 0,00111 dina/cm².s^{1,54} e um índice de comportamento reológico de 1,54. Os experimentos demonstraram que a viscosidade aparente é da mesma ordem das soluções aquosas e que os parâmetros reológicos não se modificam no decorrer da fermentação. O parâmetro J não é afetado pela viscosidade, mas é afetado pela tensão superficial do sistema que varia no decorrer da fermentação, principalmente durante o ciclo de alcalinização. Neste ciclo há a diminuição da tensão superficial com a formação abundante de espuma, que é controlada pela adição de anti-espumante.

A TDO está representada pela equação $TDO = qX$. De acordo com os estudos feitos, a fermentação para a obtenção de PAH deve ser feita em condições de limitação de oxigênio, ou seja, que a TOD deve ser mantida no intervalo $0 \leq TOD \leq 5\%$. O controle da

TOD é feito mediante programação do aumento da função $TTO = \vartheta(t)$, que por sua vez é conseguida pela ação sobre a intensidade de agitação (E) e a taxa de aeração (V_s). Considera-se que a saturação de oxigênio dissolvido (Ox^*) a T e P no meio de fermentação permanece invariável durante a fermentação.

A multiplicação celular, segundo o estudo feito, é controlada pelo valor da concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. A equação que descreve a cinética de multiplicação celular proposta anteriormente é a seguinte :

$$\frac{dx}{dt} = \left[\frac{\mu' (Ox - Ox_I)}{K_I + (Ox - Ox_I)} + \frac{\mu_{II} (Ox - Ox_{II})}{K_{II} + (Ox - Ox_{II})} \right] \cdot \left[\frac{E_1}{K_{E1} + E_1} \cdots \frac{E_n}{K_{En} + E_n} \right] x$$

A função $TTO = \vartheta(t)$ determina o fim do primeiro período e o começo do segundo. Este segundo período cinético dura até que Ox tende a Ox_{II} ou até o esgotamento do primeiro nutriente essencial (E_i).

Os valores μ' e μ_{II} são funções de mais alguns parâmetros. Hipoteticamente lhes é atribuída a mesma dependência funcional com a intensidade da turbulência local, porém não se tem evidência experimental do fato.

O estudo da biossíntese da enzima indicou que esta somente é produzida no 2º período cinético e após adição do indutor.

A cinética de formação da enzima é exponencial, ficando associada ao crescimento celular. Uma vez finalizada a multiplicação celular, cessa a produção de enzima.

Com base nos dados experimentais, propôs-se tres equações para descrever a biossíntese da PAH:

$$\begin{aligned} Y &= DX_{FA} \exp. \left[B \mu_{II} (t - t_{FA}) \right] \\ Y &= DX_{FA} \exp. \left[B (\mu_{\max} - \mu_{II}) \mu_{II} (t - t_{FA}) \right] \\ Y &= DX_{FA} \exp. \left[B (\mu_{\max} - \mu_{II}) (t - t_{FA}) \right] \end{aligned}$$

onde :

Y = concentração de PAH. (UE/ml)

t_{FA} = tempo de adição de fenilacético (h)

X_{FA} = massa celular no momento da adição de fenilacético.
(g/l)

$\mu_{max.}$, μ_{II} = velocidade específica máxima de crescimento e do segundo período, respectivamente.

As condições para a validade destas equações são:

$$\begin{aligned} \text{para } t_{FA} < t_I & \quad t_{FA} = t_I \\ & \quad X_{FA} = X_I \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{para } t_{FA} \geq t_I & \quad t_{FA} = t_{FA} \\ & \quad X_{FA} = X_{FA} \end{aligned}$$

$$\text{para } t_{FA} \geq t_{II} \quad Y = D$$

t_{II} é atingido quando $Ox \longrightarrow Ox_{II}$ ou $Ei \longrightarrow 0$

A primeira destas equações considera simplesmente que a produção de PAH depende da densidade celular no começo da produção e do incremento relativo em massa celular ($\ln X_{II}/X_{FA}$) durante o período de síntese. As outras duas equações introduzem o e feito de mais uma variável na produção de PAH. Esta variável é a velocidade específica de crescimento no segundo período (μ_{II}). De acordo com as funções propostas, quanto menor o valor de μ_{II} maior é a quantidade de enzima sintetizada, para iguais valores de X_{FA} e $\ln (X/X_{FA})$. Quando μ_{II} se iguala a $\mu_{max.}$ não se tem acúmulo de enzima, sendo $Y = D$, o conteúdo natural de PAH nas células. Quando $\mu_{II} = 0$ a produção de PAH teria de ser máxima, porém como cessa o crescimento celular cessa a biossíntese de PAH. Desde que foram obtidos diferentes valores de μ_{II} nos experimentos feitos e como foi comprovado que no período de rápido crescimento praticamente não se tem a biossíntese de PAH, introduziu-se a hipótese de uma dependência entre o valor de μ_{II} e o rendimento em PAH.

Para testar os tres modelos propostos, tomou-se um conjunto de dados provenientes dos experimentos em fermentador banco e piloto. Os experimentos foram escolhidos por terem sido realizados em condições praticamente padrões. Aqueles correspondentes ao fermentador banco (10/1 e 2) foram feitos com agitação de 390 rpm e dois níveis de aeração (1,0 e 3,0 vvm). Os escolhidos da fermentação em escala piloto foram feitos com agitação máxima de 120 rpm e dois níveis de aeração, 1,0 vvm (150/4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15) e 1,5 vvm (150/6, 7 e 8).

Para os experimentos considerados, utilizando-se os valores de μ_I , μ_{II} calculados por análise de regressão, os valores de X_{II} e Y_{II} determinados experimentalmente e o tempo de adição de fenilacético (t_{FA}), determinou-se os parâmetros X_{FA} e $(t_{II} - t_{FA})$. Para aquelas fermentações que não se completaram, ou seja, nas quais não se obteve um valor final constante da massa celular X_{II} , calculou-se este valor através da equação cinética,

$$\ln X_{II} = C_{II} + \mu_{II} (t_{II} - t_I),$$

onde t_{II} representou o tempo em que a fermentação foi interrompida. Os intervalos de μ_{II} , t_{FA} , $(t_{II} - t_{FA})$ e Y_{II} foram de 0,0137 a 0,134 h^{-1} , 2 a 17 h, 4,9 a 20,0 h, 0,22 a 1,86 UE/ml, respectivamente.

As tres equações foram transformadas a equações lineares para ser feita a análise de regressão das mesmas (19).

A primeira delas não deu correlação. A representação gráfica de $\ln \frac{Y_{II}}{X_{FA}}$ versus $(\mu_{max.} - \mu_{II}) \mu_{II} (t_{II} - t_{FA})$ correspondente à segunda equação e a de $\ln \frac{Y_{II}}{X_{FA}}$ versus $(\mu_{max.} - \mu_{II}) (t_{II} - t_{FA})$ correspondente à última são apresentadas nas figuras 18, p.86 e 19, p.87 e os parâmetros calculados de ambas equações estão apresentados no Quadro IV, p 61.

Com respeito à 2ª equação, o conjunto de experimentos pode ser subdividido em dois subconjuntos através dos quais obtém-se os coeficientes de correlação de $r_1 = 0,666$ e $r_2 = 0,938$. Combinando-se os dois conjuntos, obtém-se um coeficiente de correlação de $r = 0,177$ o que indica que a probabilidade de que as variáveis

veis propostas correlacionem é menor que 90%.

A terceira equação, representada na figura 18, agrupa também os dados experimentais em dois conjuntos cujos coeficientes de correlação são de $r_1 = 0,949$ e $r_2 = 0,977$. (Quadro IV).

O coeficiente de correlação correspondente aos dados experimentais dos dois conjuntos é de $r = 0,713$, podendo-se assegurar com 99% de confiança a relação funcional entre as variáveis propostas.

De acordo com as conclusões da análise de regressão (53) pode ser descrita a cinética da biossíntese da PAH, mediante a equação:

$$Y_{II} = 0,097 X_{FA} \exp. \left[0,195 (0,457 - \mu_{II}) (t_{II} - t_{FA}) \right]$$

O valor relativamente baixo do coeficiente de correlação assim como a amplitude dos intervalos de confiança para os coeficientes da equação são justificáveis se considerar a variabilidade inerente aos experimentos biológicos. Deve-se ter em conta que para as mesmas condições de aeração de 1,0 vvm e 120 rpm obtém-se um intervalo de variação da massa celular entre 2,91 e 8,11 g/l. Além disso, somam-se as imprecisões correspondentes ao cálculo prévio dos parâmetros cinéticos e o erro introduzido nas determinações experimentais.

O modelo proposto permite projetar a fermentação, orientando-se a mesma à produção de PAH. A equação da cinética desenvolvida permite predizer os rendimentos de enzima nas fermentações e tem utilidade nos estudos das condições hidrodinâmicas na fermentação, a fim de melhorar a produção de PAH, bem como para estudos de ampliação de escala.

5. AMPLIAÇÃO DE ESCALA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM FERMENTADOR BANCO.

Os critérios para ampliação de escala em fermentação submersa tem sido revisados por diversos autores, tais como Aiba e colaboradores (1), Wang e Humphrey (61) e Oldshue (38). Para reações químicas controladas pela transferência de massa na fase líquida, Miller (33;34) apresentou estudos bastante completos sobre translado de escala. No entanto, existe pouca informação sobre exemplos concretos de mudança de escala aplicados à produção de enzimas.

Ueda e colaboradores (55 ; 57) publicaram informações sobre escalado da fermentação para produção de Ribonuclease N1 empregando Neurospora crassa. O critério estabelecido por esses autores consiste na manutenção da mesma intensidade de agitação no modelo e no prototipo, ajustando-se a aeração para manter a concentração de oxigênio dissolvido em nível ótimo. O estudo foi feito em sistemas que não eram geometricamente similares, passando-se de frascos agitados de 500ml a um fermentador de 30 litros. A intensidade de agitação dos dois sistemas foi igualada, determinando-se o grau de dispersão de emulsões diluídas de tolueno - tetracloreto de carbono em água. O grau de dispersão foi ajustado determinando-se o diâmetro médio das gotas. De acordo com os estudos de Park e Blair (39), sobre a distribuição de tamanhos de gotas em dispersões diluídas, em tanques agitados, a ruptura das gotas somente se produz em uma região muito próxima à turbina. A uma distância maior que $D/6$ já não se produz mais ruptura. Oldshue (38), por outro lado, estabeleceu experimentalmente que o gradiente de velocidades em tanques agitados compreende somente uma zona muito próxima ao agitador. De acordo com esses conceitos o critério de igual intensidade de agitação, baseado no mesmo diâmetro médio das gotas, corresponde ao critério de igual velocidade tangencial na ponta do agitador ou igual esforço de corte causado pelo agitador. Nas revisões de escalado esse critério está condicionado a manutenção de similaridade geométrica entre o modelo e o prototipo. Porém, o fato apontado por Park (39) de que a rup

tura das gotas somente se produz em uma zona próxima ao agitador e os estudos do diâmetro médio das gotas feito por Bates e colaboradores (5) indicariam que o mesmo poderia ser estendido ao caso de tanques agitados sem similaridade geométrica. Bates, no estudo feito em tanques com diferente relação D/T e forma do agitador, concluiu que o diâmetro médio das gotas é inversamente proporcional à velocidade tangencial elevada ao expoente 1,8 , não sendo afetado pelas outras duas variáveis.

Para caracterizar a intensidade de agitação pelo diâmetro médio de Sauter (D_{SM}) das dispersões diluídas líquido-líquido, as correlações existentes revisadas por Calderbank (11; 12) indicaram uma relação funcional do tipo:

$$D_{SM} = C (P/V)^{-0,4} \phi^n, \text{ onde:}$$

P/V = potência por unidade de volume

ϕ = fração da fase dispersa.

O termo $(P/V)^{-0,4}$ vem de considerações teóricas baseadas na teoria local de Kolmogoroff, aplicada ao caso por Shinnar (49). Na caracterização das dispersões a igual D_{SM} , este critério corresponde ao de igual P/V entre modelo e prototipo, considerado nas revisões clássicas para sistemas geometricamente similares. Mlynec e Resnick (36) obtiveram o mesmo D_{SM} a igual (P/V) em tanques onde se variou o diâmetro e as dimensões do agitador.

A determinação do D_{SM} em tanques de diferentes geometrias tem sido estudado mais recentemente por Brown e Pitt (10), que estabeleceram uma correlação para o D_{SM} , dada pela equação

$$D_{SM} = C \cdot \left[\frac{\sigma}{\rho Etc} \right]^{0,6}, \text{ onde } tc \text{ é o tempo de circulação, dado}$$

$$\text{pela relação } tc = \frac{C}{N} \cdot \left[\frac{T}{W} \right]^{2/3} \cdot \left[\frac{T}{D} \right]^{8/3}.$$

Neste trabalho, o fermentador foi operado numa faixa de rotação próxima à recomendada pelo critério de igual velocidade tangencial, estendendo-se os experimentos a maiores e menores ro-

tações a fim de cobrir os valores calculados por outros critérios (Quadro VI, p.63).

Uma vez satisfeita esta primeira condição, ajustou-se a máxima taxa de aeração, a fim de manter o mesmo coeficiente volumétrico de transferência de massa (máximo) nas unidades banco e piloto, mantendo-se a tensão de oxigênio dissolvido próxima a zero. Este último aspecto, referente ao ajuste da TOD, foi condição necessária para a produção de PAH de acordo com o estudo feito em escala de laboratório e banco.

Os experimentos feitos mostraram que o máximo valor que se obtém de k_1a , está relacionado com a massa celular final obtida na fermentação, em excesso de nutrientes.

Foram feitos no fermentador piloto experimentos variando-se a velocidade tangencial entre $0,432 \leq V_t \leq 0,630$ m/s, faixa de aproximadamente $\pm 20\%$ do valor da operação no modelo banco. Variou-se as velocidades de aeração no intervalo de $0,536 \times 10^{-2} \leq V_s \leq 2,144 \times 10^{-2}$ m/s.

Procurou-se estabelecer alguma relação entre os dados experimentais obtidos e as correlações existentes na literatura, com base no critério de igual coeficiente de transferência de massa entre modelo e prototipo. Os experimentos considerados neste estudo foram os 200/1, 150/1, 2 e 3 e os valores médios dos 150/7 8 e 9 e 150/5, 6, 11, 14 e 15.

A respeito de k_1a , tem sido apresentadas na literatura um extenso número de correlações. Uma ampla revisão das mesmas foi feita por Sideman e colaboradores (50) e Calderbank (13). Estas equações relacionam k_1a ou a com a intensidade de agitação e a taxa de aeração. O fato de que algumas expressam o valor de k_1a e outras o de a se deve a que, quando o grau de dispersão é tal que o diâmetro das bolhas de ar é suficientemente pequeno para que estas se comportem como esferas rígidas, k_1 permanece constante mesmo a elevados gradientes de velocidade. Isto foi comprovado nos experimentos de Calderbank e nas deduções feitas por Hyman (26). Porém, estudos mais recentes como o de Prasher (42)

e de Miller (35) indicaram que k_1 é uma função do diâmetro de Sauter da dispersão. Quando este ultrapassa um certo valor, as bolhas não se comportam como esferas rígidas, provocando um aumento no valor de k_1 .

De acordo com os estudos de Wertertep (62,63) posteriormente confirmado por Mehta e Sharma (31) e Loucaides e Mc Manamey (30), distinguem-se duas zonas de influência, uma em que $k_1 a$ depende da intensidade de agitação e a taxa de aeração e outra em que predomina a intensidade de agitação, sendo que a taxa de aeração não tem efeito sobre $k_1 a$. Nesta última zona, a área interfacial é proporcional a $NDT^{-0,5}$, porém essa relação não corresponde à faixa de experimentação deste trabalho.

Para as condições deste estudo, no qual a transferência de massa depende da agitação e da aeração, foram consideradas as correlações desenvolvidas por Cooper e colaboradores (18), Yoshida e colaboradores (64; 65) e Calderbank (11).

A correlação de Cooper expressa o valor de $k_1 a$, medido pelo método do sulfito, em função da potência por unidade de volume com aeração (P_g/V) e velocidade de aeração associada à secção transversal unitária com aeração (E_g) entre 0,74 e 220 W/Kg para uma V_s entre $0,17 \times 10^{-2}$ e $3,05 \times 10^{-2}$ m/s e para volumes de 2,5 a 8.500 litros, sendo a relação $k_1 a = C (P_g/V)^{0,95} V_s^{0,67}$. A correlação de Yoshida, também determinada pelo método do sulfito, relaciona $k_1 a$ com a potência por unidade de volume sem aeração (P/V) e V_s , nas faixas de $E(0,30 - 32 \text{ W/Kg})$, $V_s(0,08 \times 10^{-2} - 0,72 \times 10^{-2} \text{ m/s})$ e $V(2,5 - 40 \text{ l})$, sendo a relação $k_1 a = C(P/V)^{0,666} V_s^{0,666}$.

Posteriormente, Yoshida apresentou uma correlação para a área interfacial, calculando a mesma mediante a determinação por absorção de CO_2 em alcalis. Tanques geometricamente similares apresentam uma correlação do tipo $a = C(ND)^{1,1} V_s^{0,75}$ para $V_s(0,16 \times 10^{-2} - 0,76 \times 10^{-2} \text{ m/s})$ e $E(0,26 - 5,25 \text{ W/Kg})$ e para $V(2,5 - 160 \text{ l})$. Calderbank apresentou uma relação do tipo $a = C(P_g/V)^{0,40} V_s^{0,50}$ sendo a mesma desenvolvida para uma faixa de V_s até 2×10^{-2} m/s, $E_g(0,25 - 5,25 \text{ W/Kg})$ e os valores de a determinados pela técnica de interferência de luz.

Desde que as faixas de aplicação destas correlações correspondiam total ou parcialmente às experimentadas neste trabalho, com exceção do intervalo de potência unitária estudado por Cooper, as mesmas foram testadas para os experimentos no fermentador banco e os citados previamente para ampliação da escala piloto.

Para desenvolver este estudo, foi necessário determinar experimentalmente o número de potência $N_p = \frac{P}{N^3 D^5}$ e o fator

de potência $F = \frac{E H_1 T^2}{N^3 D^5}$, pois ambos os sistemas não tinham a

configuração geométrica padrão de Rushtom. Os resultados calculados para o intervalo em que N_p e F são independentes do número de Reynolds, encontram-se no Quadro V, p. 62. Estes dados estão muito próximos aos apresentados por Bates e colaboradores (3; 4) no seu estudo do efeito das características geométricas dos agitadores sobre a potência de agitação. Confirmou-se o fato de que a relação D/T praticamente não afeta o N_p no intervalo $0,07 \leq W_b \leq 0,10$. Esta observação já havia sido comprovada experimentalmente por Brown (10).

A relação entre N_p e W/D está mais próxima a $N_p \propto (W/D)^{2/3}$, recomendada por Brown, do que a $N_p \propto (W/D)$, dada por Bates. O fator para o cálculo do N_p para duas turbinas cujo valor é 2 coincide com o de Bates, para $H_2 - H_1 \geq D$. A relação $N_p = \phi (H_1/D)$ se aproxima à apresentada por Bates.

Mediante esses valores de F , calculou-se E , correspondente aos experimentos na escala banco e piloto. Neste cálculo, levou-se em conta as características dilatantes do meio de fermentação, cujos parâmetros reológicos, determinados experimentalmente, estão no Quadro VII, p. 64. Os dados experimentais mostram que dentro da variabilidade dos experimentos, as características reológicas do meio não mudam na fermentação e as células não contribuem à reologia do meio. Calculou-se o número de Reynolds para as condições de operação, pelo método descrito por Metzner e Otto

e estendido por Calderbank e Moo-Young (14), (7).

Os valores de Re para todos os experimentos ficaram acima de $1,0 \times 10^4$, onde Np é independente do número Reynolds. Os valores calculados da potência unitária são apresentados no Quadro VIII, p. 65, sendo que os mesmos foram empregados no estudo das correlações de Yoshida.

Para o estudo das correlações de Cooper e Calderbank foi preciso obter a estimativa da potência com aeração, nos fermentadores. Para o cálculo de potência com aeração em função da potência aplicada no líquido e da velocidade de aeração foi empregada a correlação desenvolvida por Pharamond e colaboradores (41). Estes autores revisaram os estudos feitos por Ohyama e Endoh (37) e Michel e Miller (32) para o cálculo da potência com aeração e concluíram que a correlação de Ohyama e Endoh é inaplicável, sendo que a de Michel e Miller é correta, porém aplicável somente para fermentadores até 22 litros e velocidades de aeração superficial entre $(0,4 \times 10^{-2} - 0,71 \times 10^{-2} \text{ m/s})$. Estes autores desenvolveram ainda uma correlação própria, aplicável no seguinte intervalo de condições: $V_t (0,50 - 1,63 \text{ m/s})$; $V_s (0,08 \times 10^{-2} - 1,4 \times 10^{-2} \text{ m/s})$; $V (18,7 - 785 \text{ l})$. Não foi estudado o efeito das variáveis geométricas sobre a potência com aeração, limitando-se o sistema à configuração geométrica padrão e uma só turbina de disco. Obtiveram a potência com aeração (P_g) dada por $P_g = KP$, sendo o fator K dado pela seguinte correlação:

$1 - K = 1,6 Q \text{ vvm } D^{0,63}$ para $Q \text{ vvm } D^{0,63} < 0,30$, para $Q \text{ vvm } D^{0,63} > 0,30$, $K = 0,45 - 0,50$.

vvm é a vazão de ar em volume de ar, por volume de líquido por minuto.

Os valores de E_g calculados por esta correlação são apresentados no Quadro VIII, p. 65.

Para o teste das correlações, efetuou-se uma análise de regressão sobre as seguintes equações linearizadas:

$$\text{Cooper} \quad (k_1 a) \quad : \quad \ln \frac{X_{II}}{E_g^{0.95}} = C + n \ln V_s$$

$$\text{Yoshida } (k_1 a) : \ln \frac{X_{II}}{E^{0.666}} = C + n \ln V_s$$

$$\text{Yoshida } (a) : \ln \frac{X_{II}}{E^{0.366}} = C + n \ln V_s$$

$$\text{Calderbank } (a) : \ln \frac{X_{II}}{E_g^{0.40}} = C + n \ln V_s$$

Os resultados são apresentados no Quadro IX, p.66 . Obtem-se uma boa correlação entre as variáveis. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos indicam que existe correlação nas relações funcionais propostas, com um nível de 99% de probabilidade. Porém os expoentes de V_s se afastam dos valores encontrados na literatura.

De acordo com as revisões de Sideman e de Miller, na faixa de experimentação deste trabalho, o tipo de distribuidor de ar no fermentador e o regime de formação das bolhas à saída do mesmo tem muita influência no diâmetro da bolha de ar, logo sobre a e sobre k_1 . Para os mesmos valores de E e V_s , com diferentes tipos de distribuidores de ar, obtêm-se diferentes valores de $k_1 a$. Desde que nas correlações testadas, os autores empregaram tipos distintos de distribuidores, foi seguida a recomendação de Perez e Sandall (40), ou seja, introduzir como variável a velocidade do ar referida a área total dos orifícios do distribuidor (V_{SA}). A análise foi refeita para a nova variável (Quadro X, p.67), obtendo-se valores de r tais que asseguram existir correlação entre as variáveis propostas, com um intervalo de 99% de probabilidade. Com respeito aos valores dos expoentes de V_{SA} obtidos, com exceção da correlação de Cooper, estes se aproximam muito mais aos apresentados pelos autores. Para a correlação de Cooper, os valores obtidos de $V_s^{1.27}$ e $V_{SA}^{1.06}$ indicaram

que esta equação com $Eg^{0,95}$ não é recomendável para mudança de escala.

Atribui-se isto ao fato de que o intervalo de Eg , estudado por Cooper, está acima do considerado neste estudo, ou seja, a correlação de Cooper atribui um peso muito maior à dispersão do ar provocado pelo agitador do que realmente se obtém nestas condições experimentais.

Com respeito a correlação para k_1a , proposta por Yoshida (fig. 20, p. 38), obtém-se um expoente para V_{SA} de $n = 0,68$, conseguindo-se correspondência entre os dados deste experimento e os determinados pelo método de sulfito por este autor. Com respeito a equação de Yoshida, para determinação da área interfacial, o valor obtido de $n = 0,51$ difere do determinado por este autor, porém coincide com o proposto por Calderbank, o que confirmaria a influência da geometria do distribuidor no regime de formação das bolhas.

Com respeito a equação de Calderbank (fig. 21, p. 89) dentro da variabilidade dos dados experimentais, o valor obtido para n coincide com o proposto pelo autor. Considerando os resultados obtidos, pode-se admitir a viabilidade do método do sulfito para o cálculo das condições de operação na mudança de escala, porém estas podem ser previstas pela correlação de k_1a desenvolvida por Yoshida ou a desenvolvida por Calderbank.

Essas correlações podem ser aplicadas em ampliação sem manter similaridade geométrica. O emprego destas equações deve limitar-se ao intervalo de E e V_{SA} estudados, devendo ser mantida, também, dentro de valores limites, a relação entre a secção transversal do fermentador e a secção total dos orifícios do distribuidor dada por $\pi/4 (D_o)^2$, onde D_o é o diâmetro dos orifícios o qual deve ser mantido entre os valores de ambos fermentadores e $\pi/4$ é o número de orifícios necessários.

A mudança de escala poderá ser desenvolvida ainda modificando-se essas variáveis pelo emprego das equações completas para a , a fração de ar em volume (ϕ) e o D_{SM} dadas por Calderbank e corrigidas por Miller. Este introduz correções para os efeitos do

diâmetro e forma das bolhas de ar em k_1a e a aeração superficial, provocada pelo efeito de aspiração de ar pelo agitador a valores elevados de V_t .

Análise dos Rendimentos de PAH para as Condições Experimentadas no Fermentador Piloto.

Para testar o efeito da mudança da intensidade de agitação e de aeração sobre a produção de PAH, foram comparados os valores de produção de PAH obtidos nos experimentos 200/1 e 150/1,2 e 3 com os previstos pela equação:

$$Y = 0,097 \ X_{FA} \exp. \left[0,195 (0,457 - \mu_{II}) (t_{II} - t_{FA}) \right]$$

De acordo com os resultados apresentados no quadro XI ,p. 68, pode-se comprovar que não existem diferenças significativas entre os valores dos experimentos 200/1 e 150/1 e os calculados pela equação, a um nível de 90% de probabilidade. O mesmo acontece com o experimento 150/3 indicando que a V_s pode ser aumentada até valores de $2,144 \times 10^{-2}$ m/s, sem alterar os rendimentos de PAH.

A respeito do experimento 150/2 existem diferenças, porém as mesmas devem ser atribuídas a outras causas desconhecidas e independentes da agitação, desde que não existiram diferenças entre os resultados obtidos operando o fermentador a 175 rpm (exp.200/1 e 150/1) e a 120 rpm.

Com base nos experimentos feitos, pode concluir-se que a intensidade de agitação pode ser aumentada até $V_t = 0,63$ m/s, o que permite aumentar E_g , reduzindo simultaneamente a taxa de aeração.

CONCLUSÕES

1. O estudo da fermentação de E. coli para produção de PAH indicou a conveniência de desenvolver a mesma mantendo a concentração de oxigênio dissolvido limitada.

2. A fermentação em meios baseados em água de maceração de milho transcorre com dois períodos cinéticos exponenciais, sendo a passagem de um para outro uma resposta à limitação de oxigênio.

3. A velocidade específica de crescimento no primeiro período é bem maior que no segundo, podendo atingir o valor máximo de $0,457 \text{ h}^{-1}$. Ambas aparentemente estão ligadas a intensidade local da turbulência no fermentador.

4. O modelo matemático proposto por Tsao e Hanson para cinética exponencial com esgotamento sucessivo de nutrientes estimulantes pode ser estendido ao caso de limitação do oxigênio.

5. A massa celular máxima formada nas fermentações é proporcional (em excesso de nutrientes) à taxa de transferência de oxigênio máxima no fermentador.

6. O incremento gradual da taxa de transferência de oxigênio, combinado com o controle da tensão de oxigênio dissolvido, permitiu controlar a duração relativa dos períodos cinéticos.

7. O acúmulo de PAH somente se produz uma vez adicionado o indutor e quando a velocidade específica do crescimento atinge valores menores que μ_{max} , sendo maior quanto menor o valor de μ_{II} . A produção segue uma cinética exponencial. De uma análise das variáveis que intervêm no processo foi possível desenvolver o seguinte modelo cinético para descrever a formação do PAH:

$$Y = 0,097 X_{\text{FA}} \exp. \left[0,195 (0,457 - \mu_{\text{II}}) (t_{\text{II}} - t_{\text{FA}}) \right]$$

8. Nos intervalos de variação da intensidade de agitação e da taxa de aeração experimentados, a TTO é proporcional à potência unitária exponenciada a $m(E^{\text{III}})$ e a velocidade de aeração relativa a secção transversal do fermentador com exponencial de $n(Vs^n)$.

Foi realizada uma ampliação de escala desde um fermenta

dor escala banco com 10 litros de meio, até um fermentador piloto com 150 - 200 litros de meio de fermentação. Não foi mantida similaridade geométrica entre as duas unidades. O critério aplicado foi o de manter na mesma ordem a velocidade tangencial no modelo e no prototipo, igualando simultaneamente a $(TT0)_{max}$ em ambas unidades.

9. Foram testadas as correlações de Cooper e Yoshida para o coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_1a) e as de Yoshida e Calderbank para a área interfacial. A correlação de Cooper é inaplicável na faixa de condições de operação experimentada. As condições ensaiadas no fermentador banco e piloto podem ser descritas pelas equações de Yoshida para k_1a ou a de Calderbank para a área interfacial, desde que nas mesmas se substitua V_s por V_{SA} , a velocidade de aeração associada a secção total dos orifícios do distribuidor.

10. Na substituição de V_s por V_{SA} o expoente n obtido coincide com as correlações de Yoshida e de Calderbank para a , provando a influência na área interfacial e na transferência de massa do regime de formação das bolhas de ar.

11. A fermentação pode ser ampliada de escala, projetando-se as condições de operação mediante as equações modificadas de Yoshida para k_1a ou de Calderbank para a , desde que seja mantida a mesma relação S/SA e o diâmetro de orifícios do distribuidor (D_o) da mesma ordem.

12. Esta ampliação pode ser estendida a fermentadores que não sejam geometricamente similares.

13. Foram comparados os rendimentos de PAH obtidos experimentalmente, para um intervalo de V_t (0,432 - 0,630 m/s), com os previstos pelo modelo cinético de produção de PAH. Não se encontraram diferenças significativas a um nível de 90%. A velocidade tangencial (V_t) do agitador pode ser aumentada até 0,63 m/s, diminuindo substancialmente a vazão do ar.

QUADRO I

Experimentos em Fermentador de Laboratório

Experimento							0,5/1	0,5/2	0,5/3	0,5/4	0,5/5
Aeração (v.v.m)							0-1	0-1,9	0-1,1	0-2,0	0-2,0
Agitação (r.p.m)							500-600	500-600	500-650	500-700	500-600
% T.O. dissolvido							4,1	13,7	15,5	25,0	82,8
M.de Cultura Nº							3	3	3	3	2
Glicose; A.M.Milho (g/l)							8;50	8;50	8;50	8;50	10;12,5
Hora de adição do fenila cético							4,25	5,0	4,66	3,0	3,5
Massa celular à 5ª hora(g/l)							1,6	2,31	1,1	2,0	1,35
Massa celular final							3,15	3,0	1,9	3,3	2,0
Tempo de fermentação (h)							17	13	16	12	12
1ª correção de pH (h)							6,5	5,0	5,5	5,0	-
PAH (UE/ml)							0,095	0,062	0,045	0,073	(+)
PAH (UE/mg)							0,030	0,020	0,024	0,022	-

QUADRO II

Experimentos em fermentador banco

Experimento		10/1	10/2
aeração máxima (v.v.m)		3,0	1,0
agitação (r.p.m)		390	390
μ_I (h^{-1})		0,457	0,250
desvio padrão, $S\mu_I$		0,015	0,011
constante da equação $\ln X = C_I + \mu_I t$		-1,314	-0,131
SC_I		0,077	0,045
coeficiente de correlação r_I		0,9956	0,9874
μ_{II}		0,0652	0,0463
$S\mu_{II}$		0,0067	0,0069
C_{II}		1,394	1,124
SC_{II}		0,075	0,061
r_{II}		0,9696	0,9396
Coordenadas da mudança cinética			
X_I (g/l)		6,33	4,09
t_I (h)		6,91	6,16
massa celular final X_{II}		10,66	5,13
tempo total para atingir X_{II} , t_{II}		14,92	11,04
tempo em que se adicionou o fenilacético		2,00	2,00
t_{FA}			
Produção de PAH Y_{II} (UE/ml)		1,60	0,60
Y_{II} (UE/mg)		0,150	0,117

QUADRO III

Experimentos em fermentador piloto

Experimento		200/1	150/1	150/2	150/3	150/4	150/5	150/6	150/7
aeração máxima (v.v.m)		0,50	0,50	1,00	2,00	1,00	1,00	1,50	1,50
agitação (r.p.m)		175	175	155	120	120	120	120	120
μ_I (h^{-1})		-	0,457*	0,305	0,305*	0,370*	0,370*	-	-
desvio padrão SM_I		-	-	0,013	-	-	-	-	-
constante da equação $\ln X = C_I + \mu_I t$		-	1,590	-0,410	-1,112	-1,684	-1,716	-	-
SC_I		-	-	0,071	-	-	-	-	-
coeficiente de correlação r_I		-	-	0,962	-	-	-	-	-
μ_{II}		0,260	0,0610	0,0237	0,0355	0,0328	0,0342	0,0999	0,134
SM_{II}		0,008	0,0054	0,0086	0,0022	0,0030	0,0027	0,0087	0,013
C_{II}		-0,552	0,295	1,664	1,612	0,886	0,876	-0,550	-1,515
SC_{II}		0,063	0,0684	0,093	0,029	0,055	0,044	0,139	0,215
r_{II}		0,998	0,973	0,722	0,982	0,973	0,982	0,974	0,970
Coordenadas da mudança cinética									
X_I (g/l)		-	1,80	6,28	6,29	3,11	3,12	-	-
t_I (h)		-	4,76	7,37	6,40	7,62	7,72	-	-
Massa celular final X_{II}		6,80	4,13	7,30	9,45	5,69	5,22	7,17	6,40
tempo total para atingir t_{II}		9,50	18,40	13,67	17,80	26,00	22,60	25,20	25,16
tempo em que se adicionou o fenilacético t_{FA}		5,00	2,00	2,00	6,00	2,00	11,00	12,00	17,00
Produção PAH Y_{II} (UE/ml)		0,10	0,31	0,216	1,40	1,86	1,20	0,53	0,22
Y_{II} (UE/mg)		0,0147	0,0752	0,030	0,148	0,327	0,230	0,074	0,034

* valor tomado de outro experimento

QUADRO III (continuação)

Experimento	150/8	150/9	150/10	150/11	150/12	150/13	150/14	150/15
aeração máxima (v.v.m)	1,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
agitação (r.p.m)	120	120	120	120	120	120	120	120
μ_I (h^{-1})	0,457*	0,457*	0,172*	0,457*	0,457*	0,370	-	0,172
S_{PI}	-	-	-	-	-	0,040	-	0,030
C_I	-0,852	-1,314	-0,793	-1,403	-0,195	-1,392	-	-1,544
SC_I	-	-	-	-	-	0,184	-	0,192
r_I	-	-	-	-	-	0,972	-	0,957
μ_{II}	0,0675	0,0372	0,0545	0,0545	0,0137	0,0364	0,0620	0,0643
S_{PII}	0,0055	0,0025	0,0022	0,0013	0,0029	0,0022	0,0023	0,0030
C_{II}	1,313	0,903	0,636	0,235	0,622	0,380	-0,389	-0,374
SC_{II}	0,059	0,052	0,042	0,024	0,054	0,028	0,061	0,055
r_{II}	0,987	0,984	0,995	0,998	0,860	0,968	0,995	0,994
X_I	5,41	3,00	3,35	1,53	2,31	1,77	-	1,38
t_I	5,56	5,28	11,00	4,00	2,26	5,31	-	10,86
X_{II}	9,07	7,73	8,11	5,27	2,91	3,67	5,47	4,59
t_{II}	13,21	30,68	26,74	26,20	32,57	25,30	33,68	29,52
t_{PA}	8,00	16,00	14,50	14,00	12,00	3,00	15,75	14,00
Y_{II}	0,32	0,32	1,42	0,78	0,70	0,61	1,31	0,26
$\dot{Y}_{II}$	0,035	0,041	0,175	0,148	0,241	0,166	0,239	0,057

Quadro IV

Análise de Regressão das Equações Propostas para a Cinética de
Produção de PAM

Parâmetros	E Q U A Ç Ã O	
	$\ln(Y_{II}/X_{FA}) = \ln D + B(\mu_{\max} - \mu_{II})\mu_{II}(t_{II} - t_{FA})$	$\ln(Y_{II}/X_{FA}) = \ln D + B(\mu_{\max} - \mu_{II})(t_{II} - t_{FA})$
CONJUNTO I .	8 experimentos	8 experimentos
B	3,235	0,240
S _B	1,281	0,028
Intervalo de confiança p/ 90%	± 1,304	± 0,028
lnD	- 1,840	- 2,235
SlnD	0,322	0,144
Intervalo de confiança p/ 90%	± 0,338	± 0,147
r ₁	0,666 $r \geq 0,666$ p/95% de confiança	0,949 $r \geq 0,834$ p/ 99% de confiança
CONJUNTO II	5 experimentos	5 experimentos
B	4,598	0,212
S _B	0,763	0,021
Intervalo 90%	± 0,723	± 0,021
lnD	-3,631	-2,926
SlnD	0,263	0,125
Intervalo 90%	± 0,249	± 0,118
r ₂	0,938 $r \geq 0,934$ p/98% de confiança	0,977 $r \geq 0,959$ p/ 99% de confiança
CONJUNTO (I e II)	13 experimentos	13 experimentos
B	3,192	0,195
S _B	1,791	0,053
Intervalo 90%	± 0,669	± 0,052
lnD	-1,783	-2,331
SlnD	0,529	0,291
Intervalo 90%	± 0,542	± 0,302
r	0,177 $r \geq 0,407$ p/ 90% de confiança	0,713 $r \geq 0,708$ p/ 99% de confiança

QUADRO V

Cálculo do número de potência e o fator de potência unitária

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

$$F = \frac{E}{\frac{N^3 D^5}{T^2 H_L}}$$

Condições : água a 20°C

Modelo tipo fermentador banco. D = 0.115 m

Re X 10 ⁻⁴	P (vatios)	E (m ² /s ³)	N _p	F
1,65	0,443	0,015	11,29	15,68
3,17	3,321	0,109	11,95	16,10
4,75	10,856	0,354	11,57	15,49

$$\bar{N}_p = 11,6$$

$$\bar{F} = 15,8$$

Modelo tipo fermentador piloto. D = 0,085 m

Re X 10 ⁻⁴	P (vatios)	E (m ² /s ³)	N _p	F
2,72	2,685	0,306	11,18	14,95
3,66	5,771	0,660	9,90	13,27
4,63	11,412	1,304	9,66	12,94
5,50	20,311	2,321	10,29	13,79
6,31	33,590	3,840	11,24	15,05
7,31	46,092	5,268	10,02	13,31

$$\bar{N}_p = 10,4$$

$$\bar{F} = 13,9$$

QUADRO VI

Cálculo das condições de operação no fermentador piloto baseadas nos dados do fermentador banco para os critérios de ampliação de escala considerados.

Fermentador banco : agitação : 390 rpm.

Critério de ampliação de escala	rpm
Igual potência unitária	181
Igual velocidade tangencial no agitador	141
Igual DSM segundo Brown e Pitt	142

QUADRO VII

Características reológicas do meio de fermentação

Modelo de Ostwald-de Waele $\tau = K\dot{\gamma}^n$

τ : tensão de cisalhamento dina/cm²

$\dot{\gamma}$: taxa de cisalhamento (S⁻¹)

K : índice de consistência

n : índice de comportamento reológico

Valores de $\dot{\gamma}$ empregados : 303,3, 399,0, 532,1, 702,3, S⁻¹

Meio de cultura	ln K	n	r
	-6,852	1,541	0,999
Meio de fermentação densidade celular 1,16 g/l	-6,712	1,522	0,999
Idem após filtração	-6,923	1,553	0,999
Meio de fermentação 1,88 g/l	-6,833	1,540	0,999
Idem após filtração	-6,857	1,542	0,999
Meio de fermentação 3,70 g/l	-6,433	1,483	0,999
Idem após filtração	-7,047	1,572	0,999
Meio de fermentação 3,94 g/l	-6,688	1,520	0,999
Idem após filtração	-6,915	1,551	0,999
Meio de fermentação 6,50 g/l	-6,837	1,542	0,999
Idem após filtração	-7,012	1,564	0,999
Conjunto de todos os experi- mentos sem filtração	-6,693 [±] 0,342*	1,520 [±] 0,052	0,998
Conjunto de todos os experi- mentos com filtração	-6,962 [±] 0,331	1,558 [±] 0,037	0,999

* intervalos de confiança para 95% de probabilidade.

QUADRO VIII

Valores da potência unitária (E), potência unitária com aeracão (Eg), velocidade do ar referida à secção transversal do fermentador (Vs) e a secção do distribuidor de ar (V_{SA})

Experimento	$E (m^2/s^3)$	$E_g (m^2/s^3)$	$V_s (m/s)$	$V_{SA} (m/s)$
10/1	0,906	0,453	$1,105 \times 10^{-2}$	21,654
10/2	0,906	0,616	$0,368 \times 10^{-2}$	7,218
200/1	0,617	0,429	$0,536 \times 10^{-2}$	16,443
150/1	0,812	0,564	$0,536 \times 10^{-2}$	16,443
150/2	0,565	0,283	$1,072 \times 10^{-2}$	32,886
150/3	0,262	0,131	$2,144 \times 10^{-2}$	65,772
150/7,8,9	0,262	0,131	$1,608 \times 10^{-2}$	49,329
150/5,6,11,14,15	0,262	0,131	$1,072 \times 10^{-2}$	32,886

QUADRO IX

Análise de regressão para as correlações propostas na bibliografia empregando V_S

Equação	Cooper (kla)		Yoshida (kla)		Yoshida (a)		Calderbank(a)	
	$\ln \frac{X_{II}}{(E_g)^{0,95}}$	vs $\ln V_S$	$\ln \frac{X_{II}}{E^{0,666}}$	vs $\ln V_S$	$\ln \frac{X_{II}}{E^{0,366}}$	vs $\ln V_S$	$\ln \frac{X_{II}}{(E_g)^{0,4}}$	vs $\ln V_S$
Parâmetros								
n	1,272		0,832		0,623		0,746	
Sn	0,155		0,117		0,105		0,105	
lnC	9,082		6,269		5,088		5,915	
Slnc	0,735		0,554		0,495		0,498	
r	0,945		0,929		0,904		0,929	

QUADRO X

Análise de regressão para as correlações propostas na literatura, empregando V_{SA}

Equação	Cooper (kla)		Yoshida (kla)		Yoshida (a)		Calderbank (a)	
	$\ln \frac{X_{II}}{(Eg) 0,95}$	vs $\ln V_{SA}$	$\ln \frac{X_{II}}{E 0,666}$	vs $\ln V_{SA}$	$\ln \frac{X_{II}}{E 0,366}$	vs $\ln V_{SA}$	$\ln \frac{X_{II}}{(Eg) 0,4}$	vs $\ln V_{SA}$
Parâmetros								
n	1,057		0,683		0,509		0,584	
Sn	0,160		0,122		0,117		0,127	
Intervalo de confiança para 90%	$\pm 0,311$		$\pm 0,237$		$\pm 0,227$		$\pm 0,247$	
lnC	-0,298		0,162		0,544		0,531	
Slnc	0,52		0,400		0,385		0,417	
Intervalo de confiança pa ra 90%	$\pm 1,010$		$\pm 0,777$		$\pm 0,748$		$\pm 0,810$	
r	0,919		0,893		0,834		0,851	

QUADRO XI

Análise das condições de fermentação para produção de PAN

Experimento	Valor experimental de Y_{II} $\ln Y_{II}$	Valor de Y_{II} predito pela equação cinética $\ln Y_{II}$	Intervalo para 90% de confiança
200/1	-2,302	-1,410	$\pm 0,890$
150/1	-1,171	-0,691	$\pm 0,864$
150/2	-1,532	0,0159	$\pm 0,865$
150/3	0,336	0,442	$\pm 0,802$

FIGURA 1

Cinética de multiplicação celular

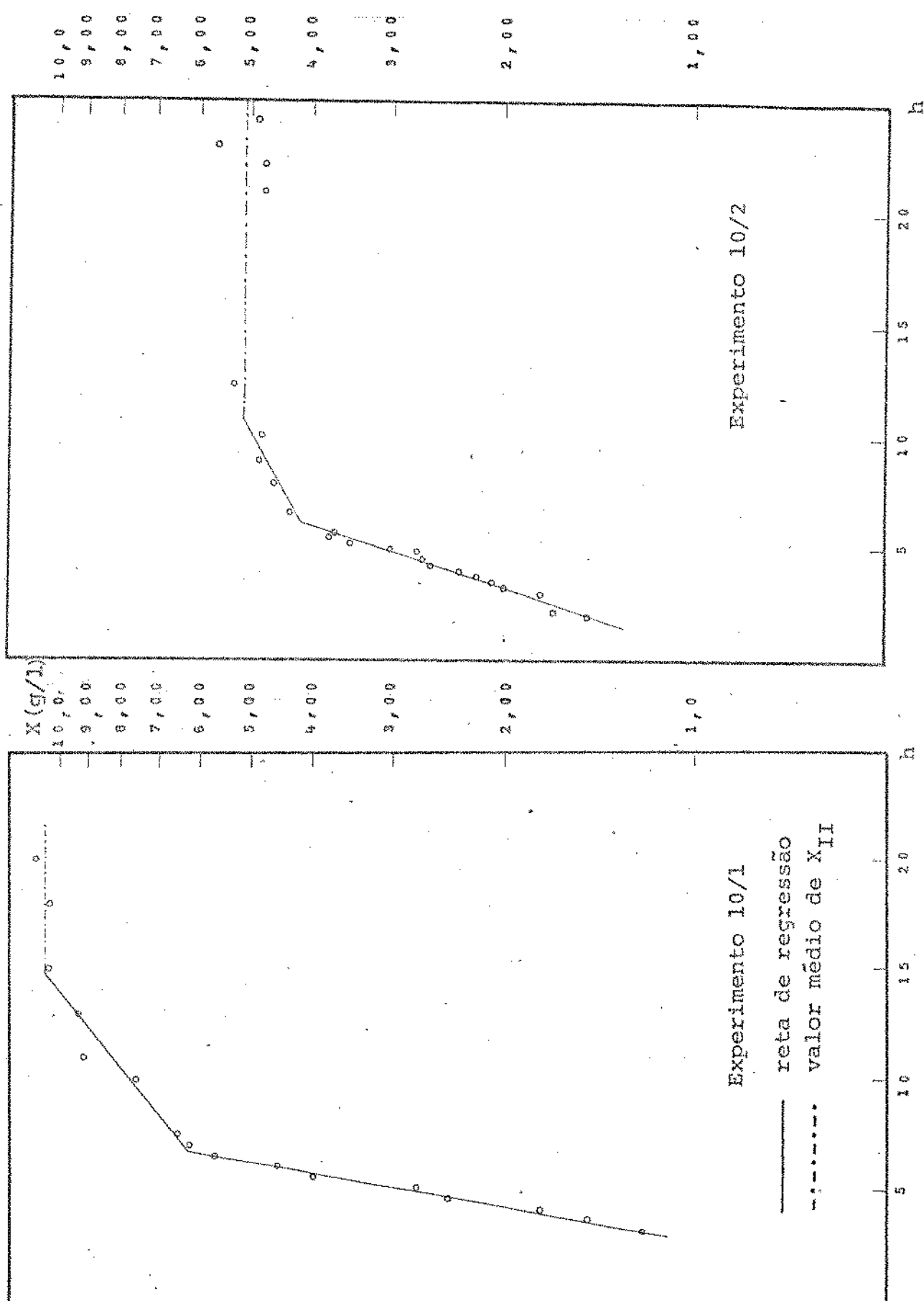


Figura 2

Determinação do começo da fase de crescimento exponencial
e consumo de carboidratos.

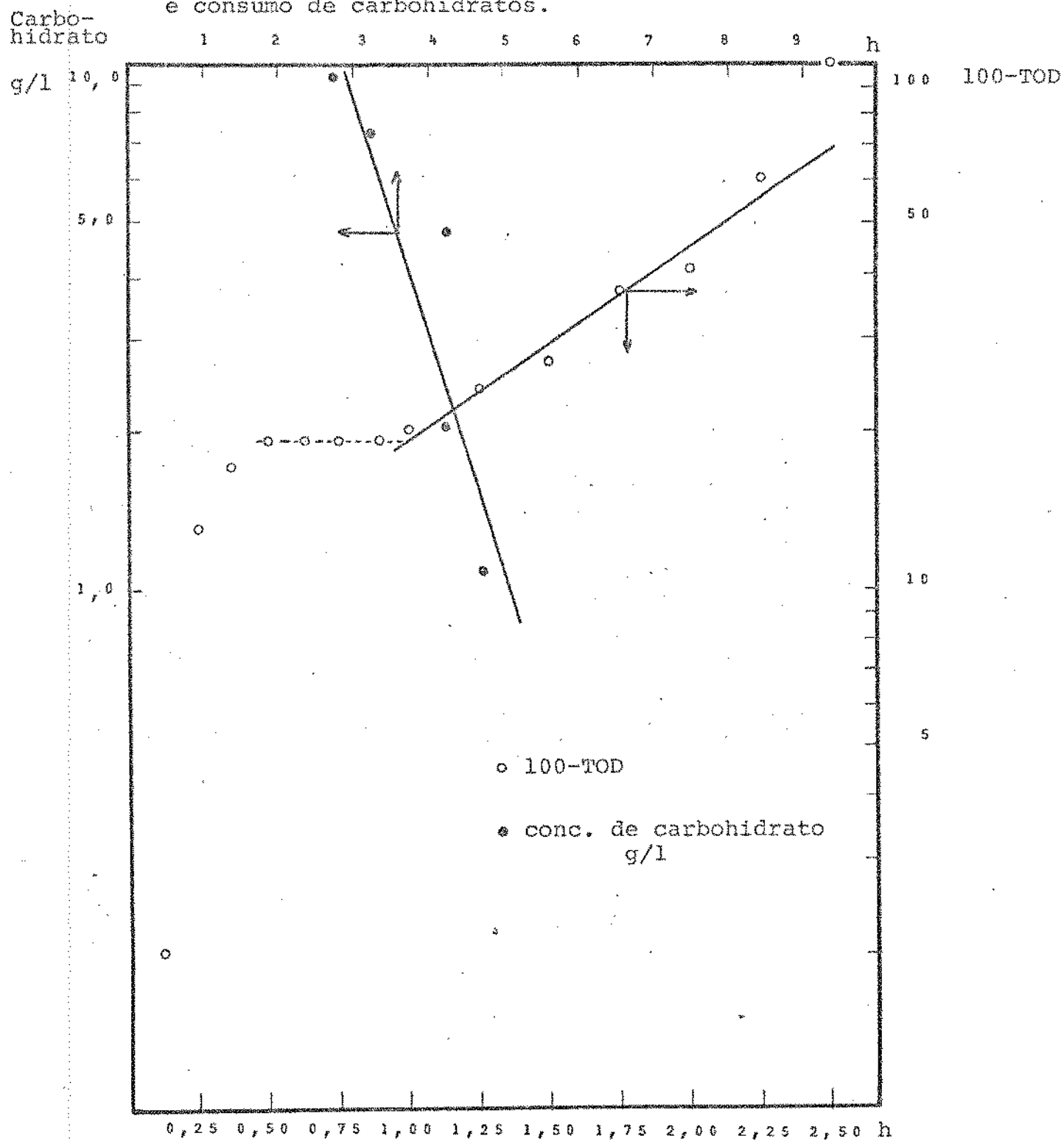


Figura 3
Cinética de multiplicação celular

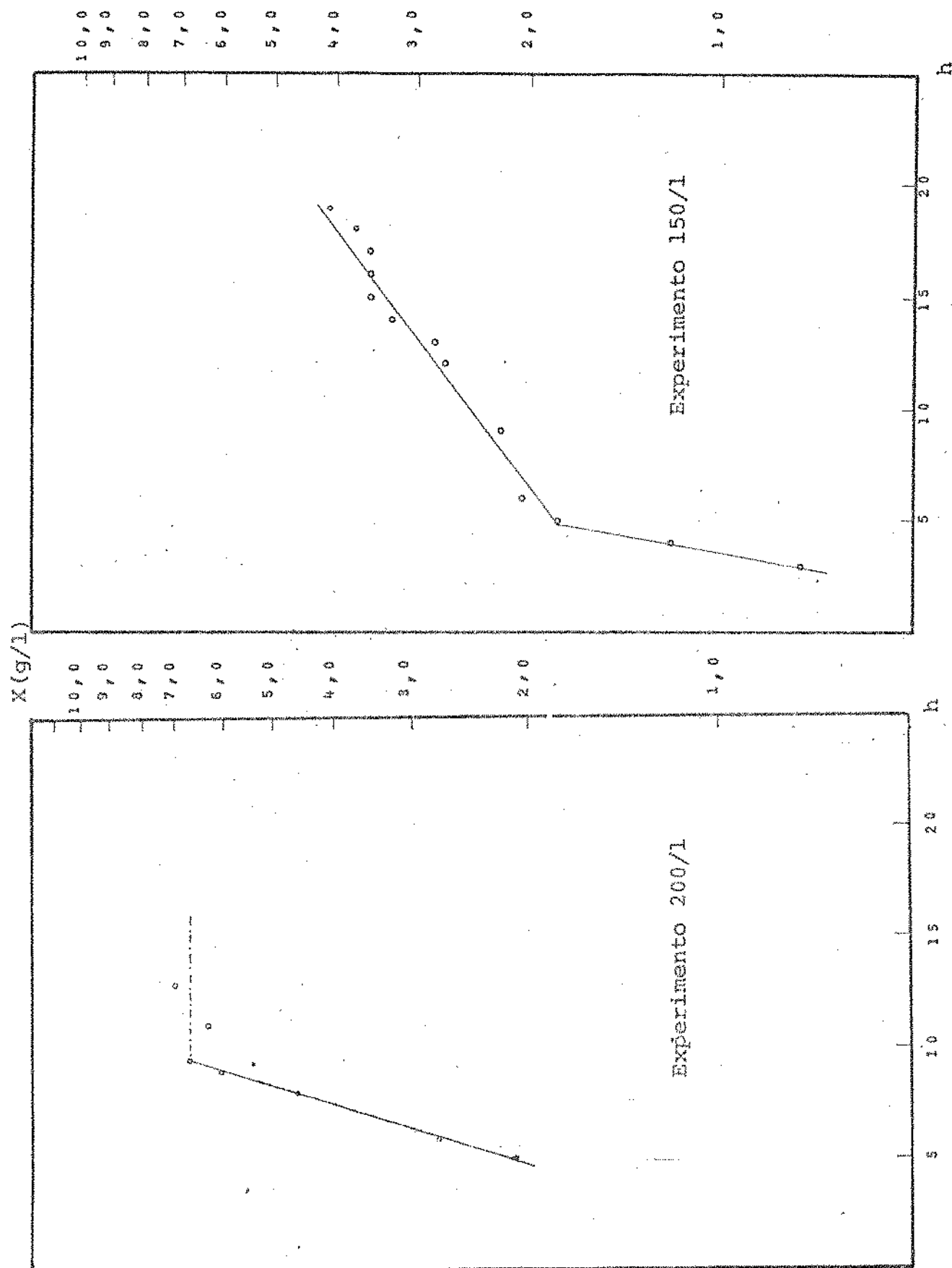


Figura 4

Cinética de multiplicação celular

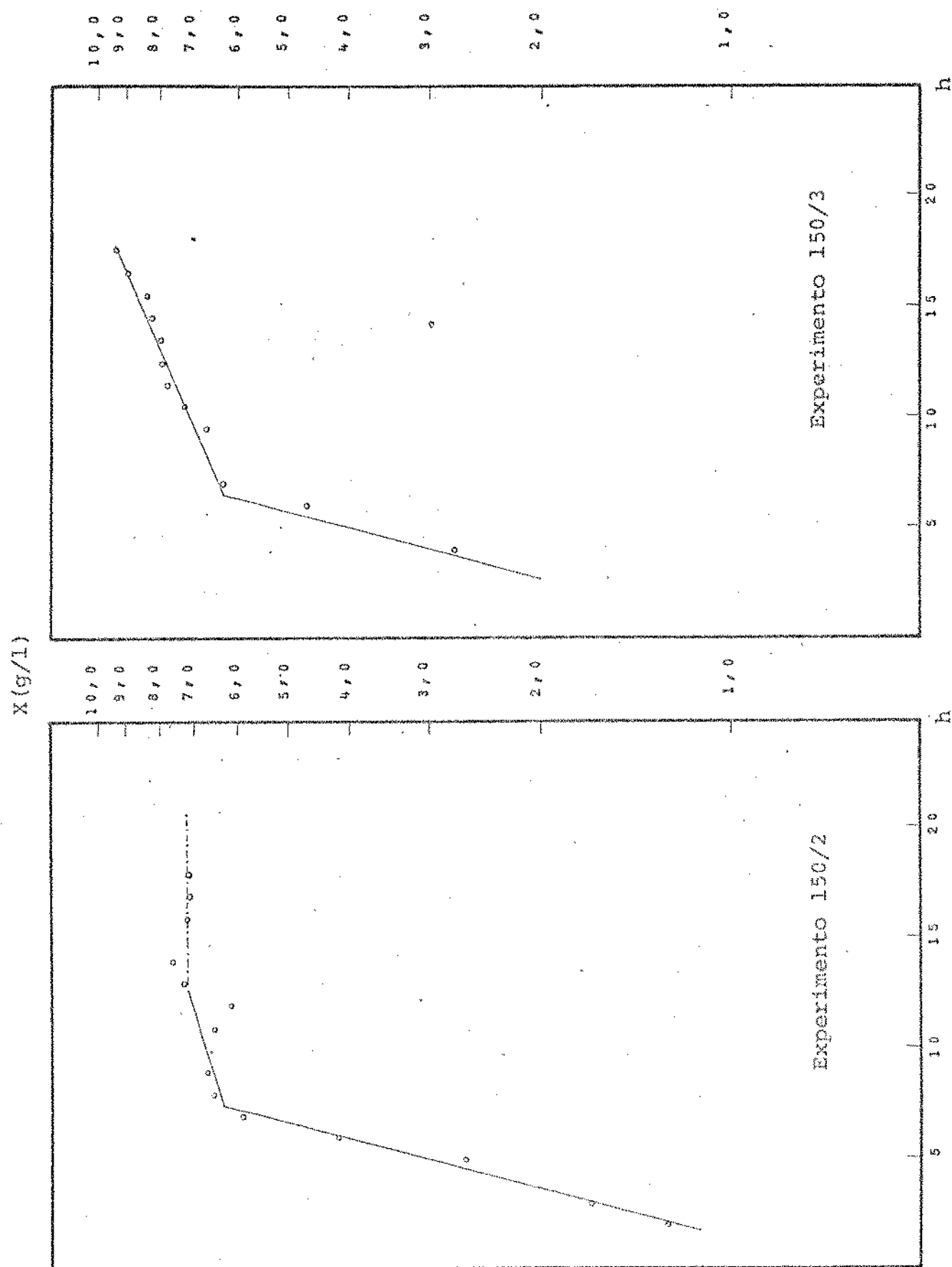


Figura 5

Cinética de multiplicação celular

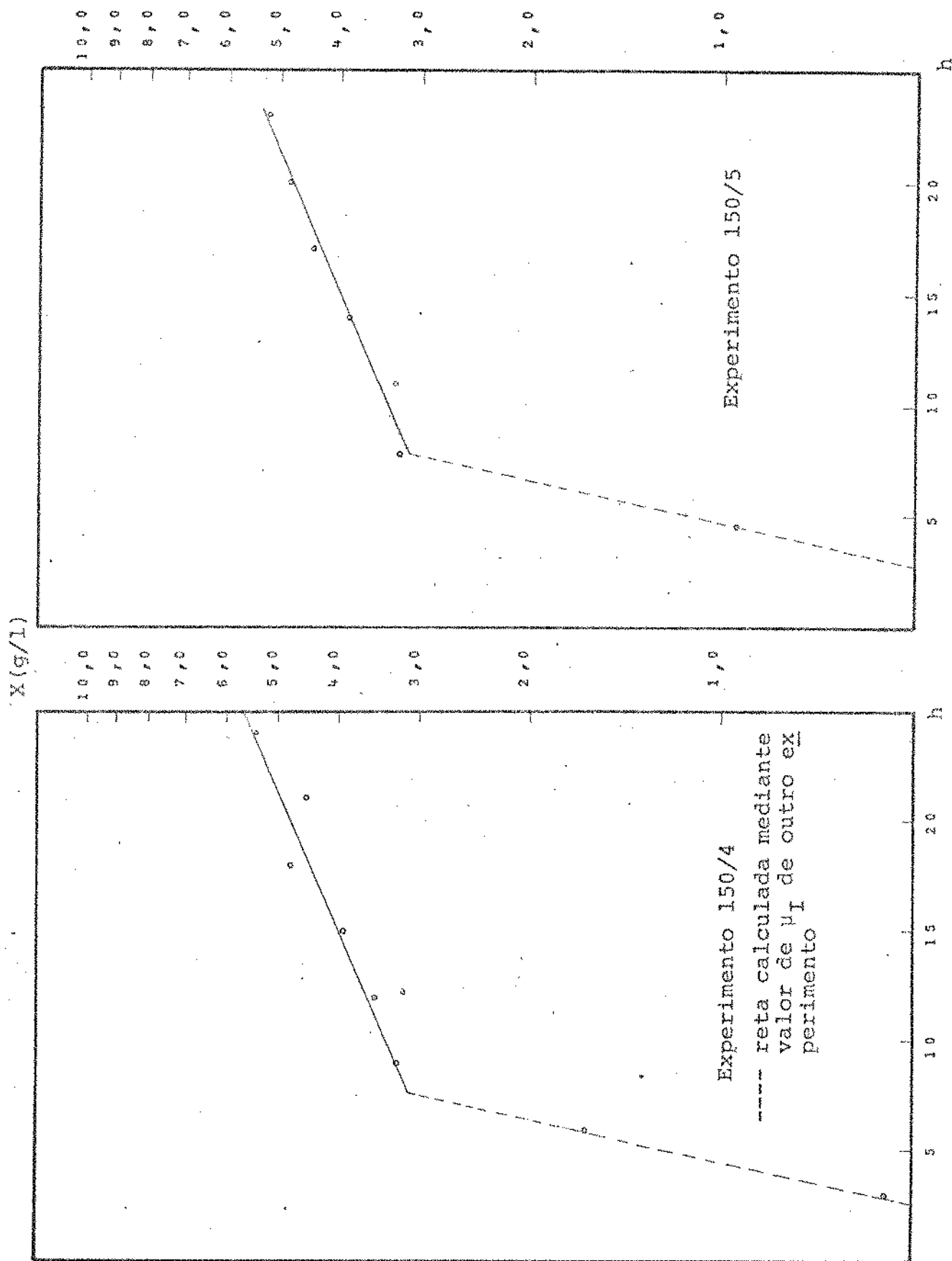


Figura 6
Cinética de multiplicação celular

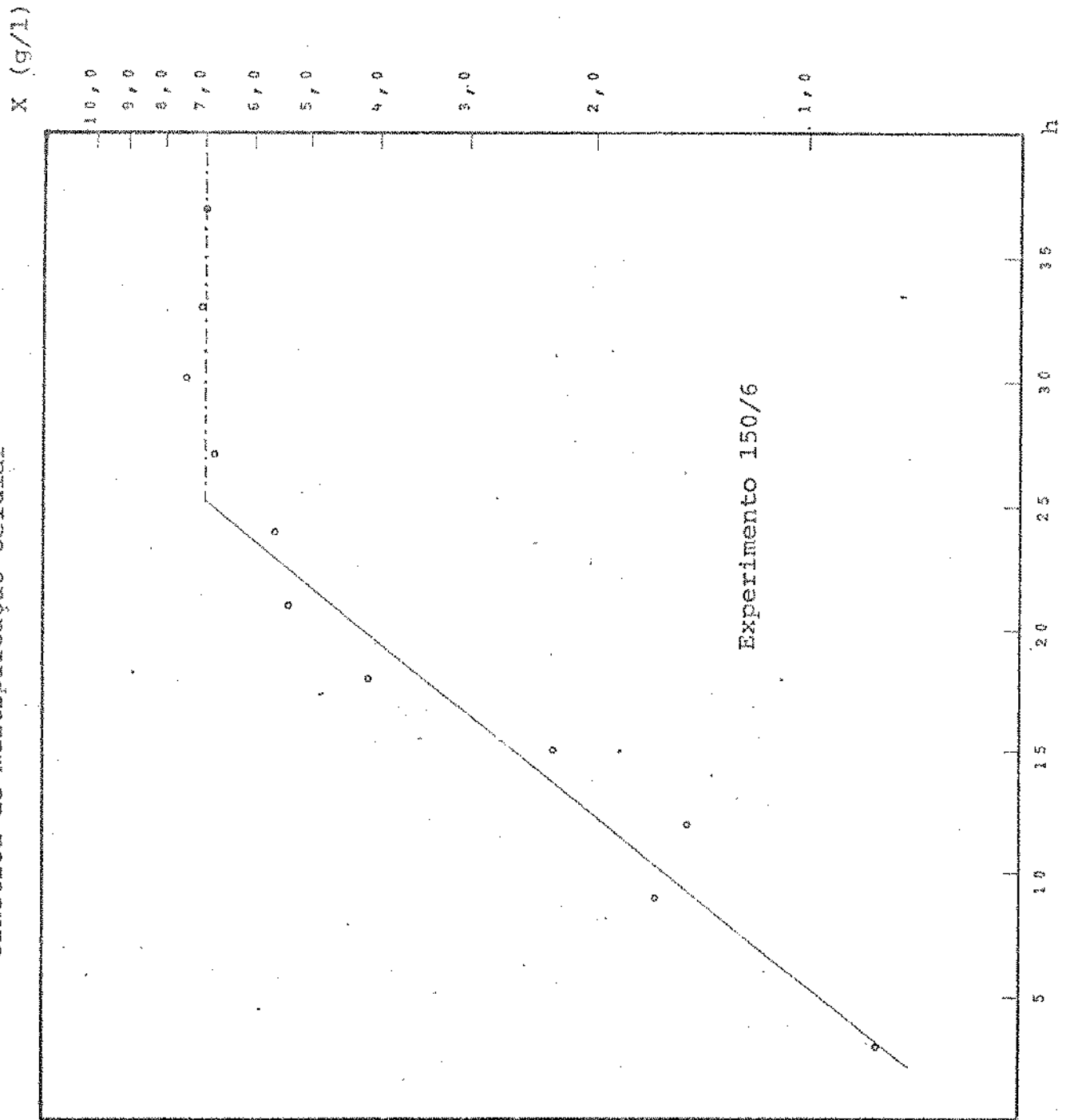


Figura 7

Cinética de multiplicação celular

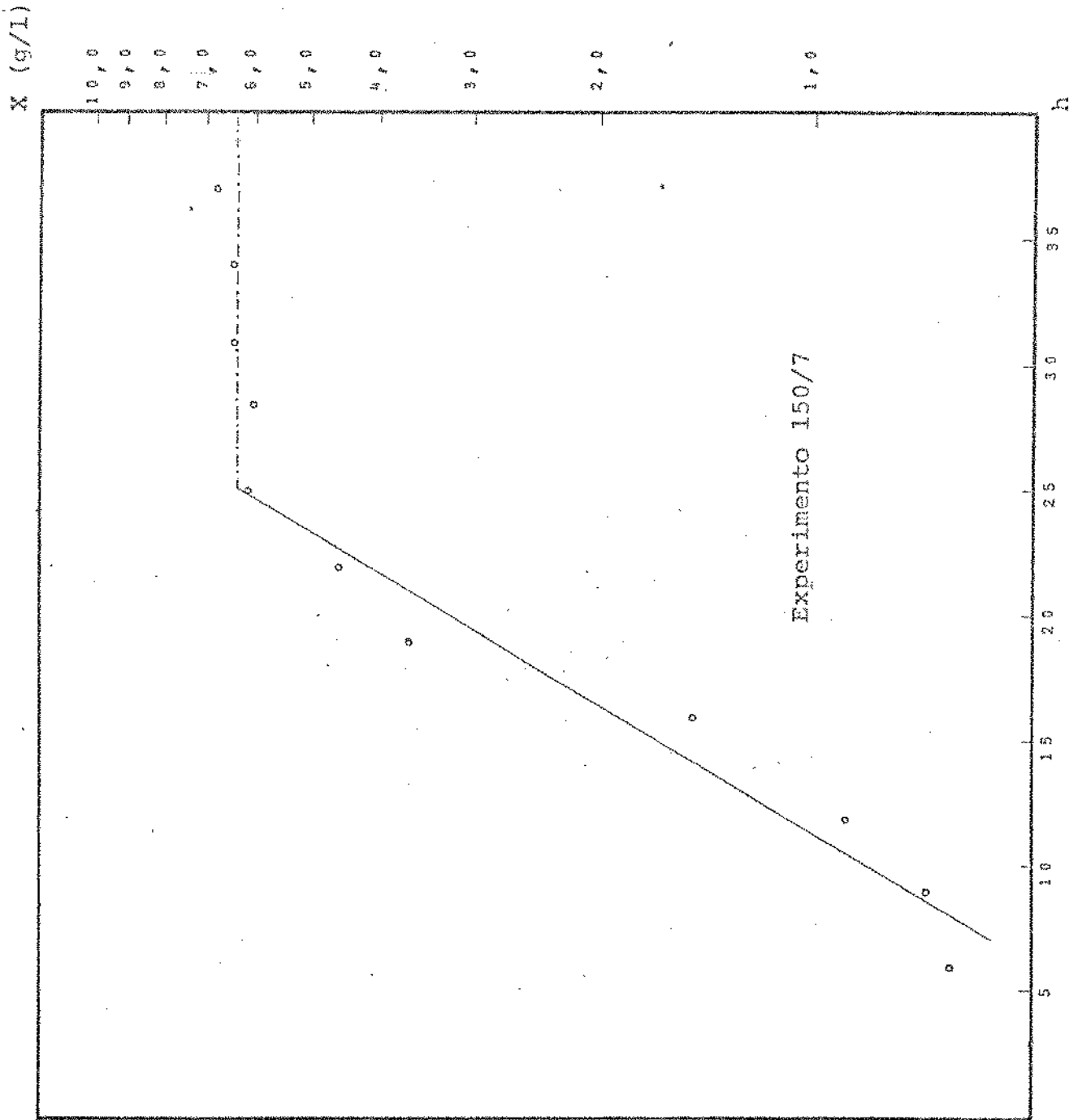


Figura 8
Cinética de multiplicação celular

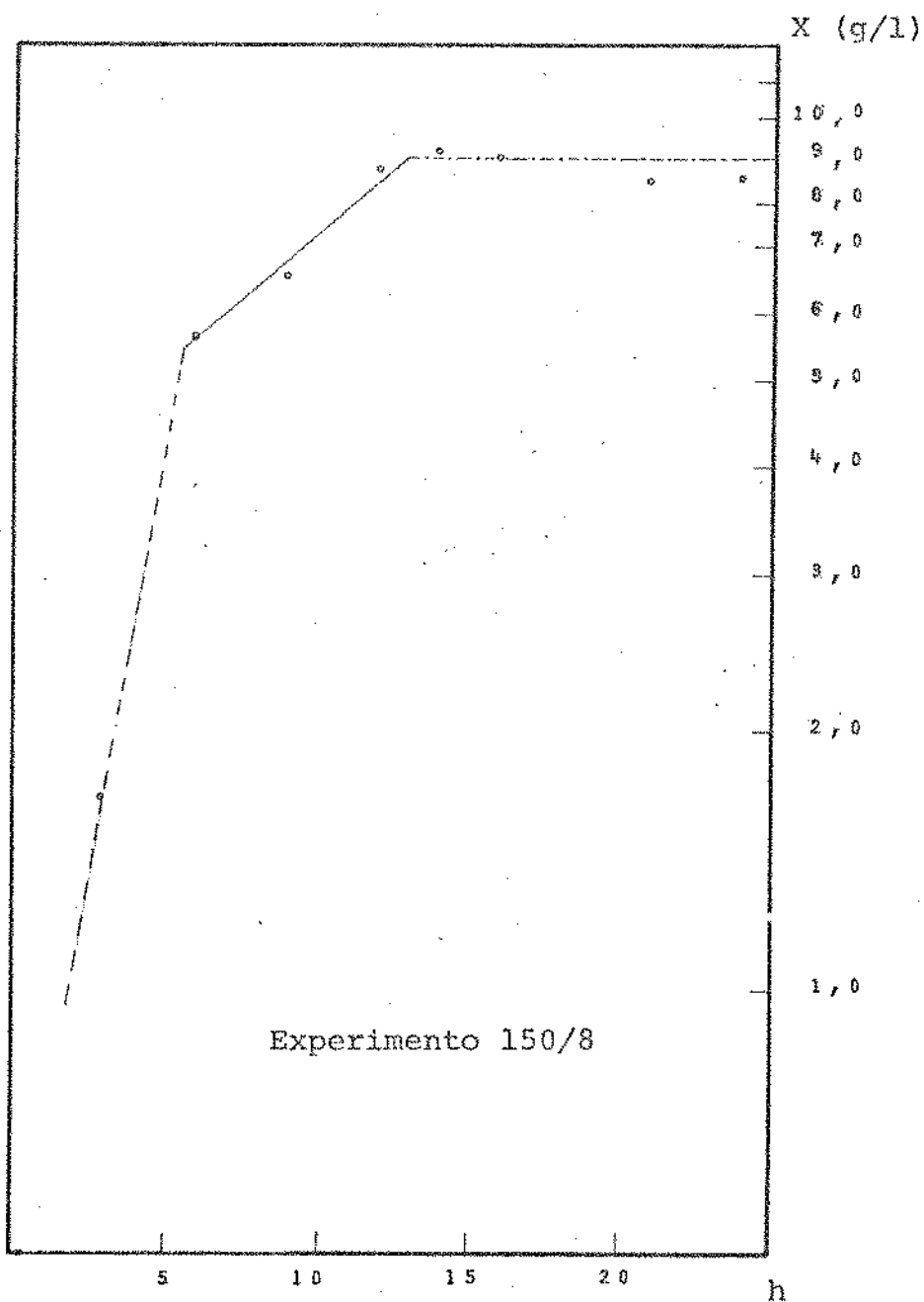


Figura 9
Cinética de multiplicação celular

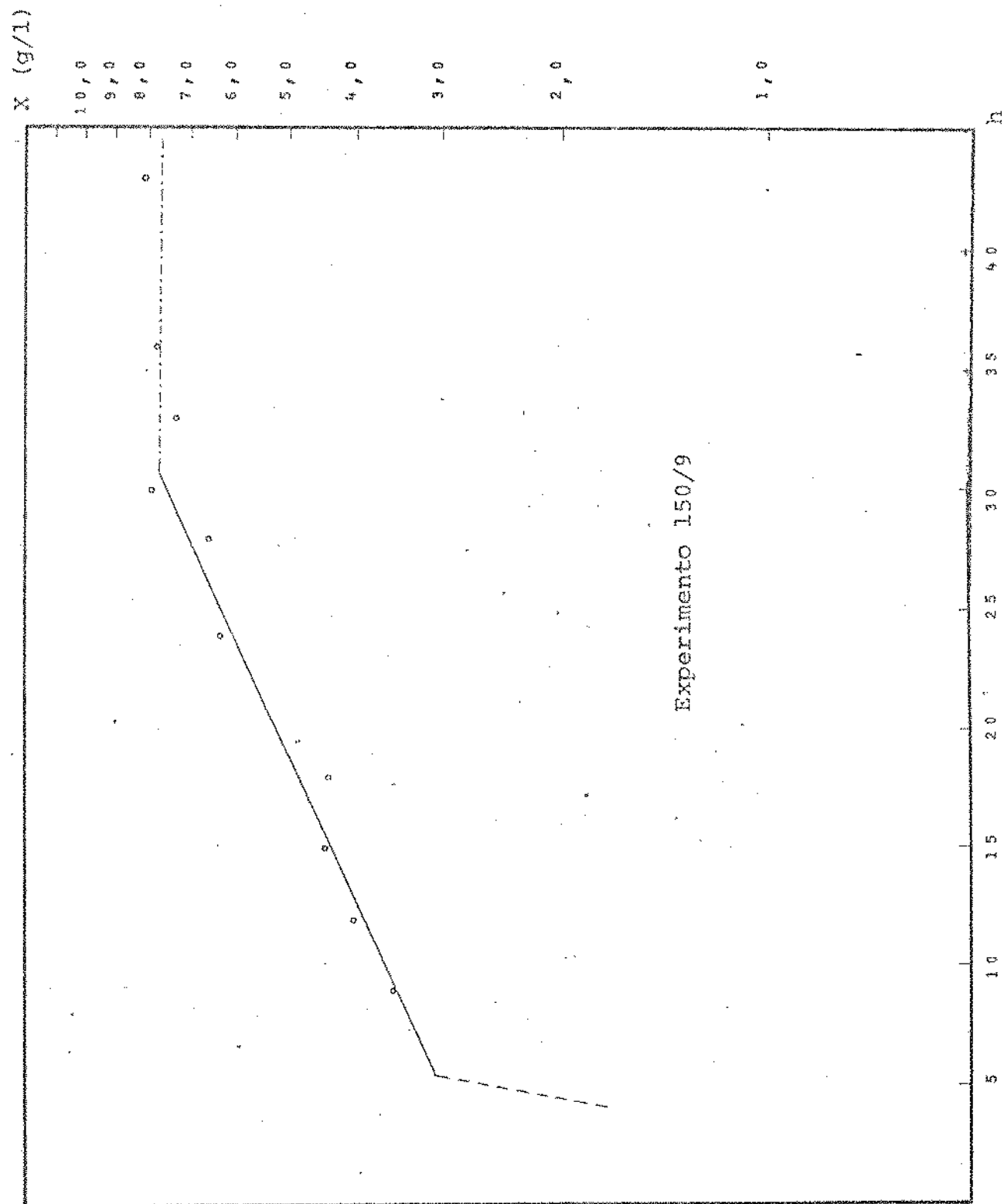


Figura 10
Cinética de multiplicação celular

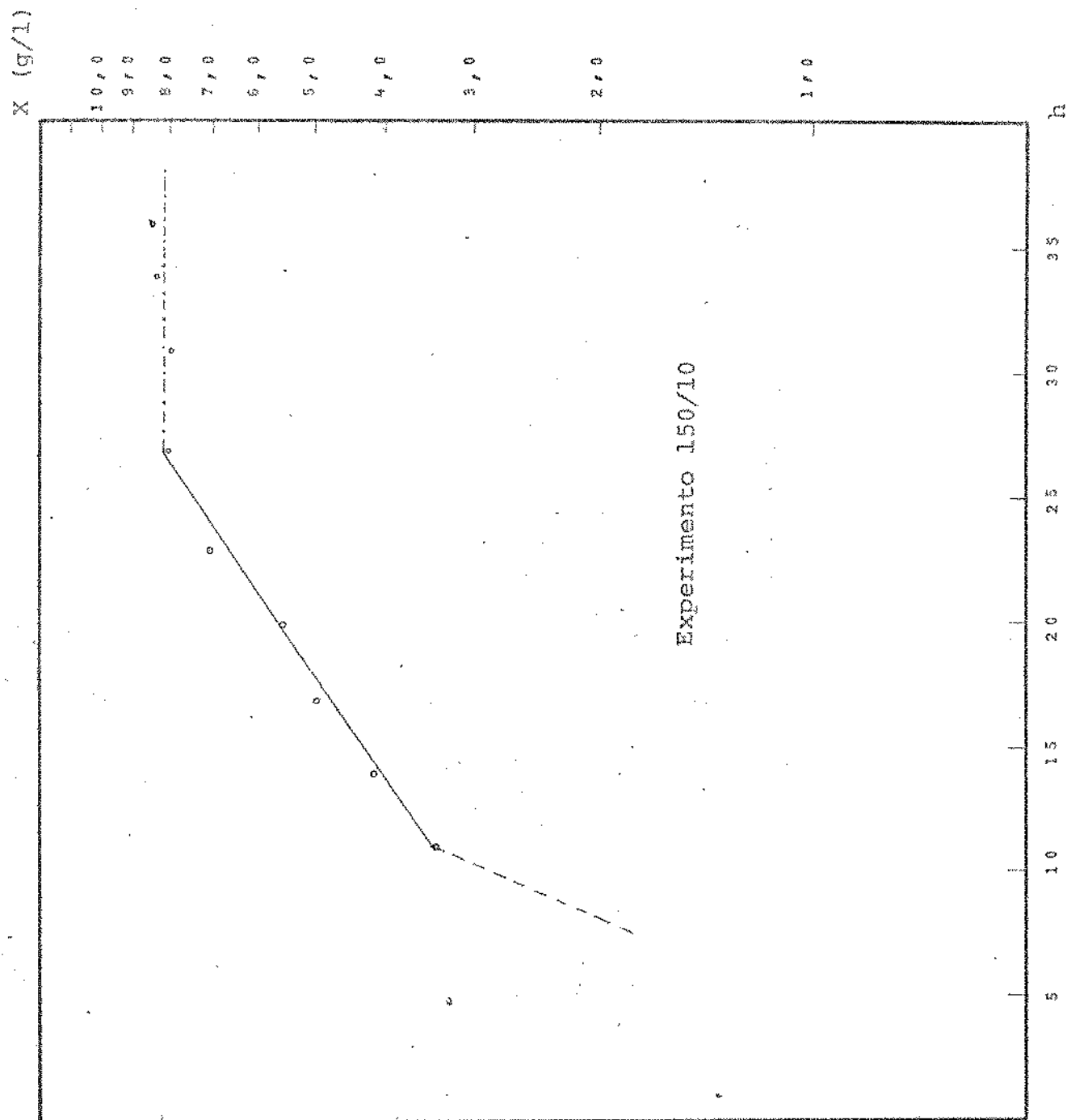


Figura 11

Cinética de multiplicação celular

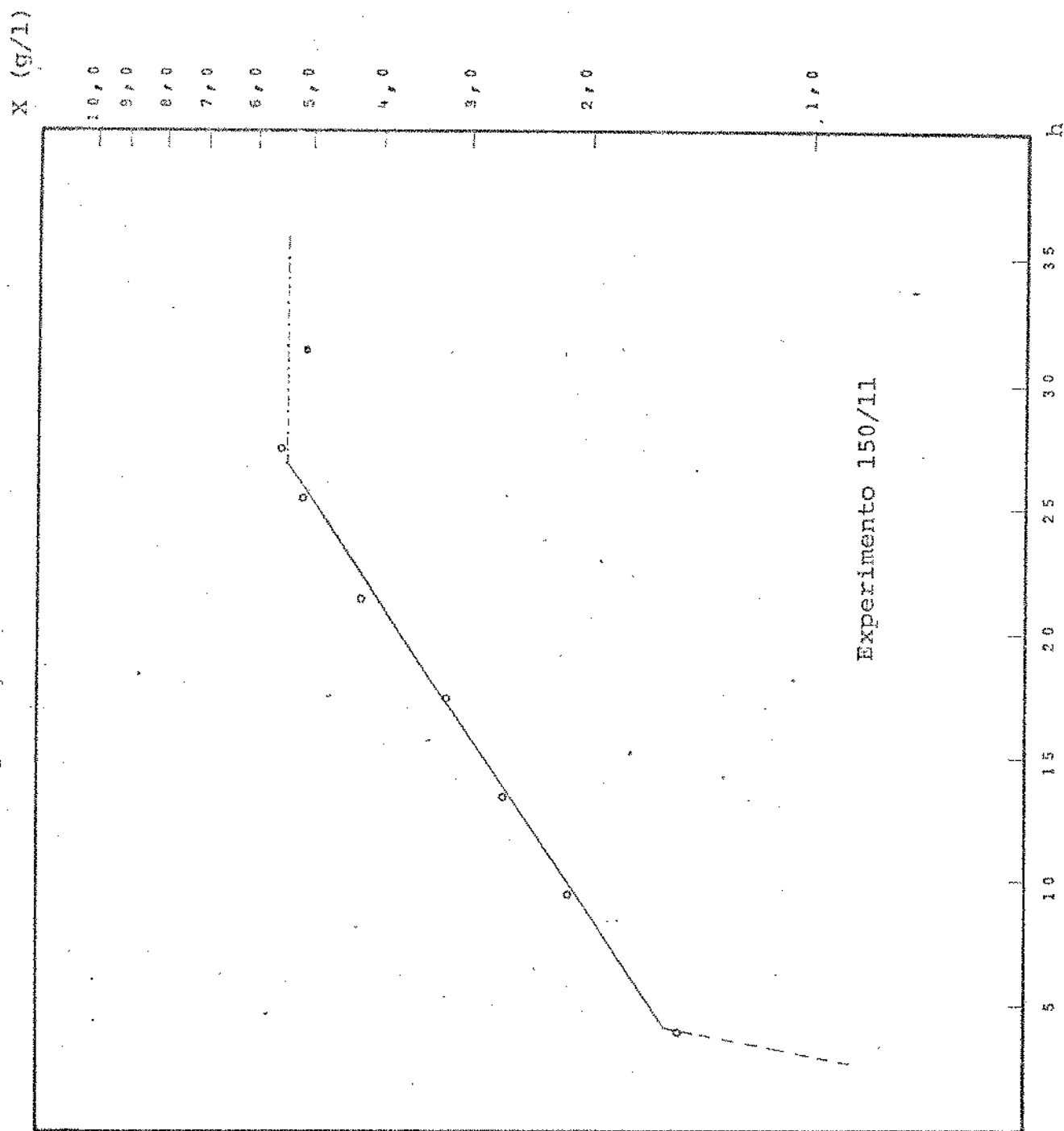


Figura 12

Cinética de multiplicação celular

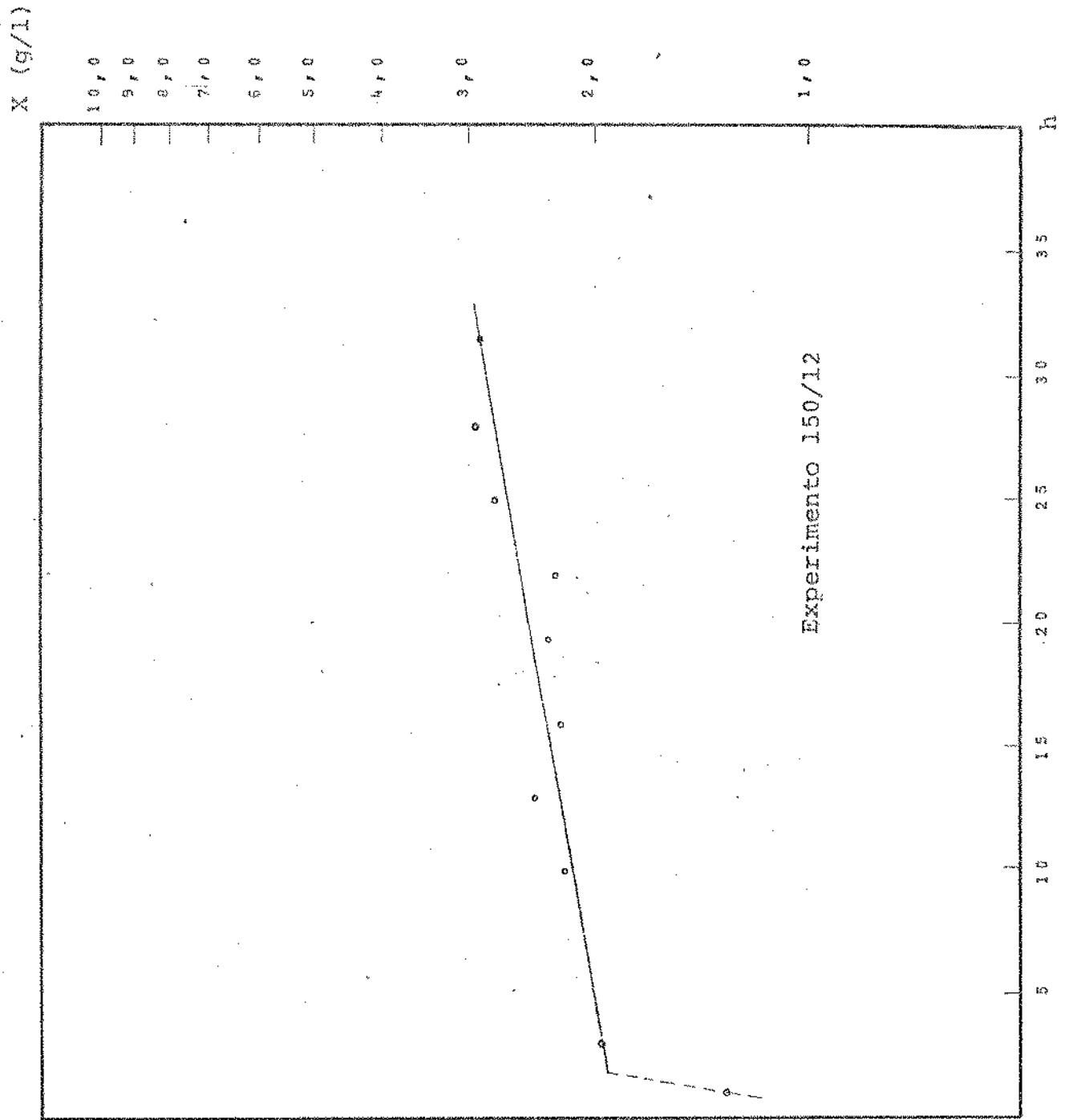


Figura 13
Cinética de multiplicação celular

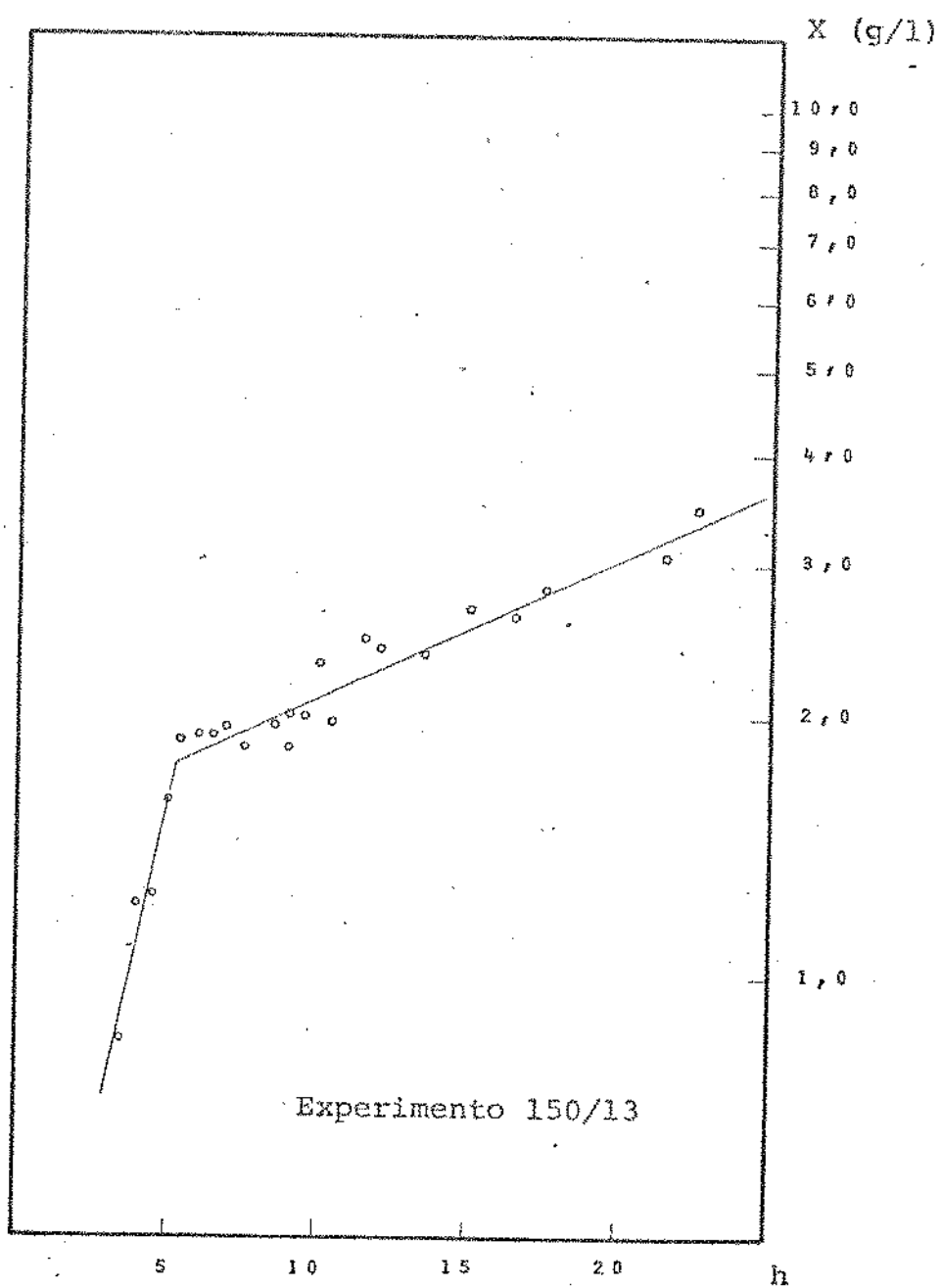


Figura 14

Cinética de multiplicação celular

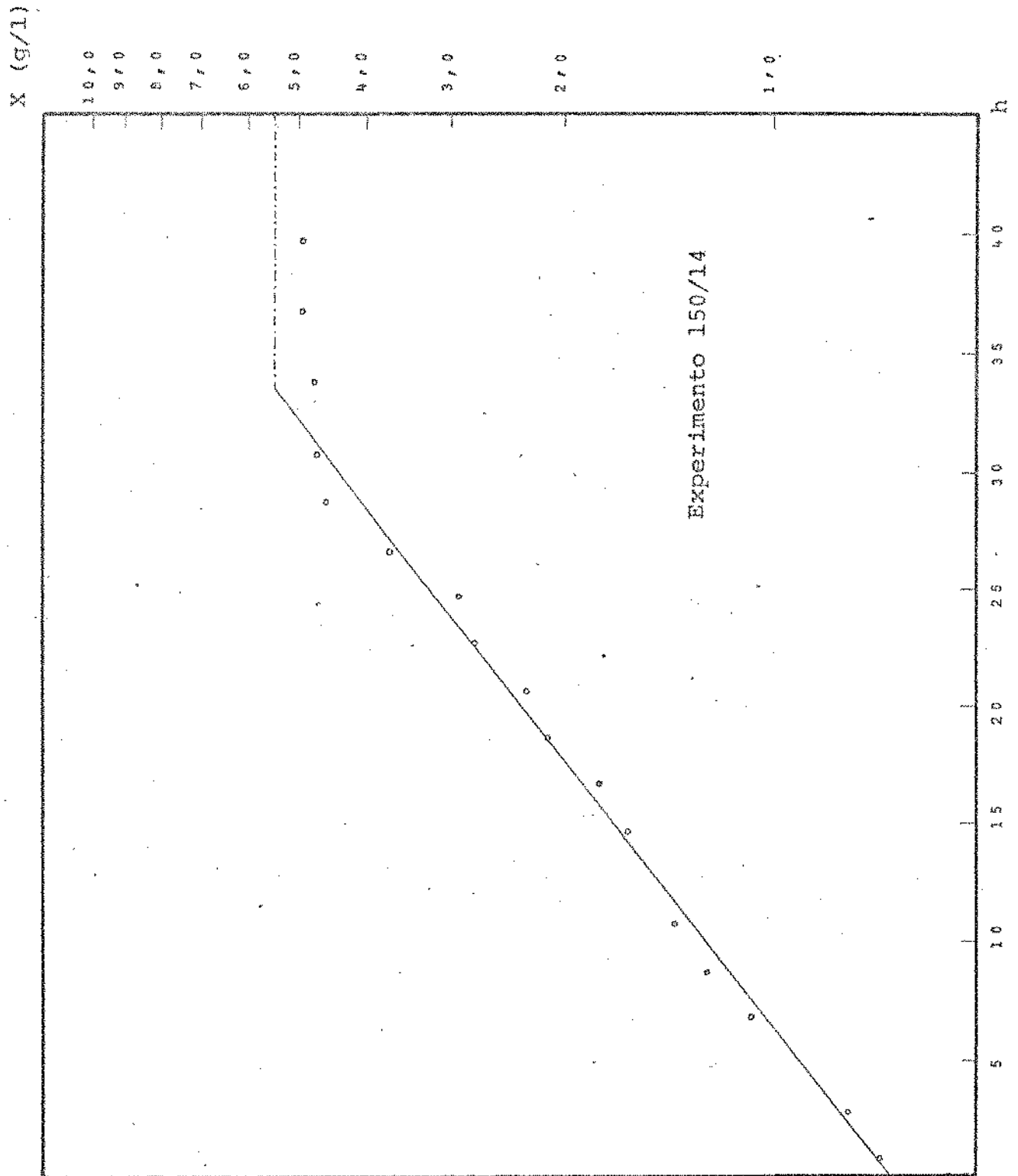


Figura 15

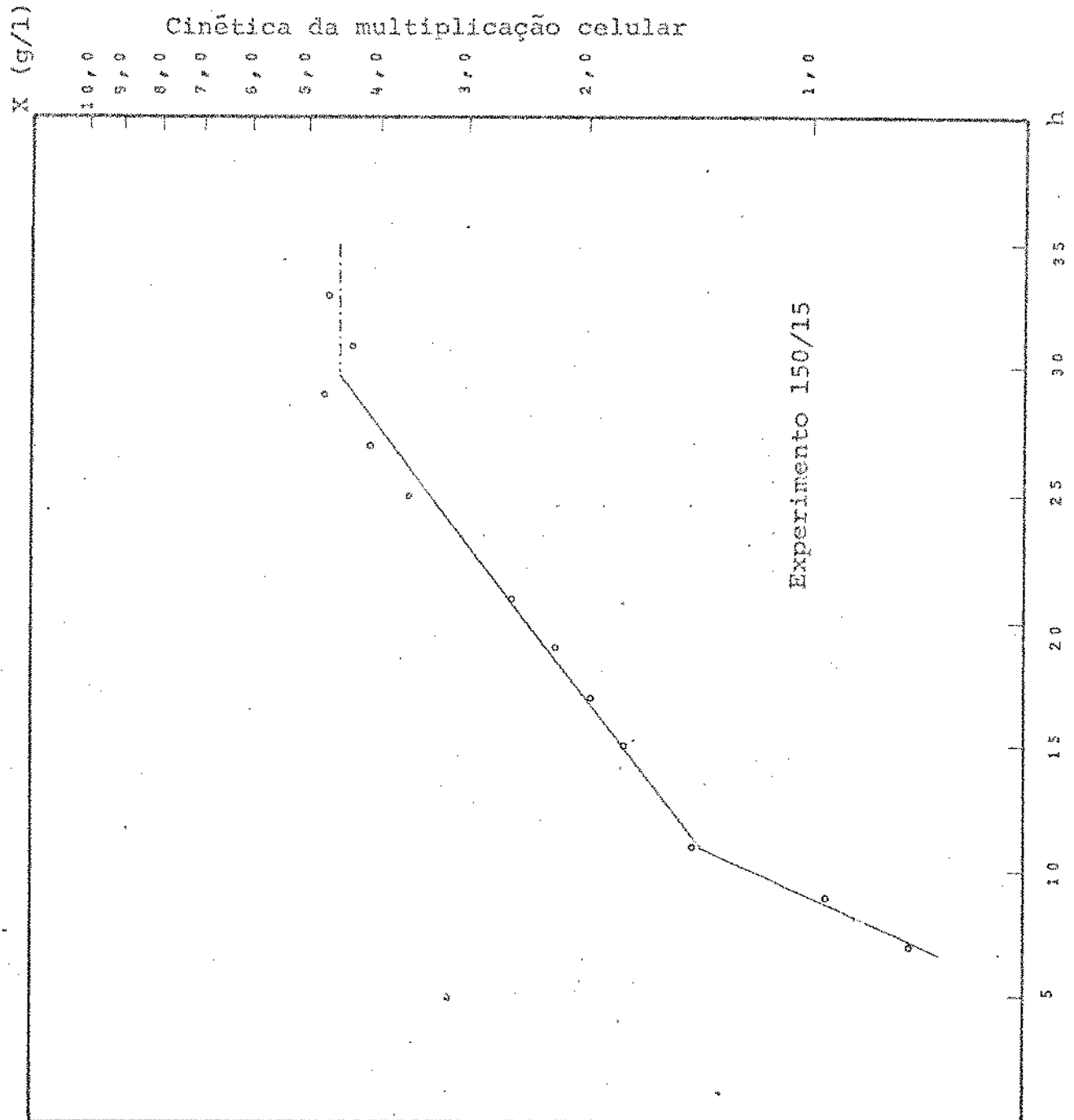


Figura 16
 Incremento da TIO em função do tempo
 $\frac{N^{1.98} (v.v.m)^{0.66}}{(120)^{1.98} (1.0)^{0.66}}$

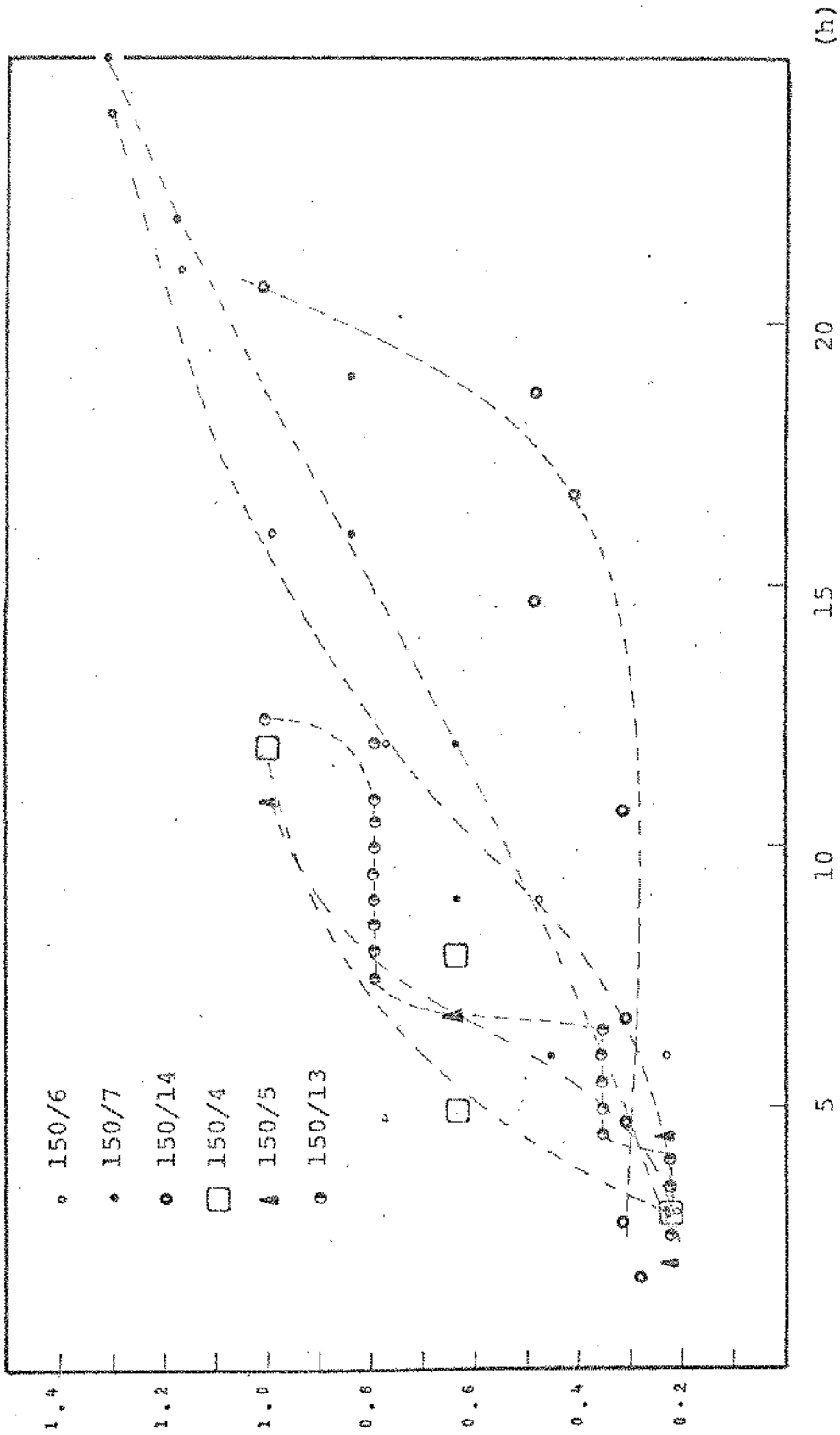


Figura 17

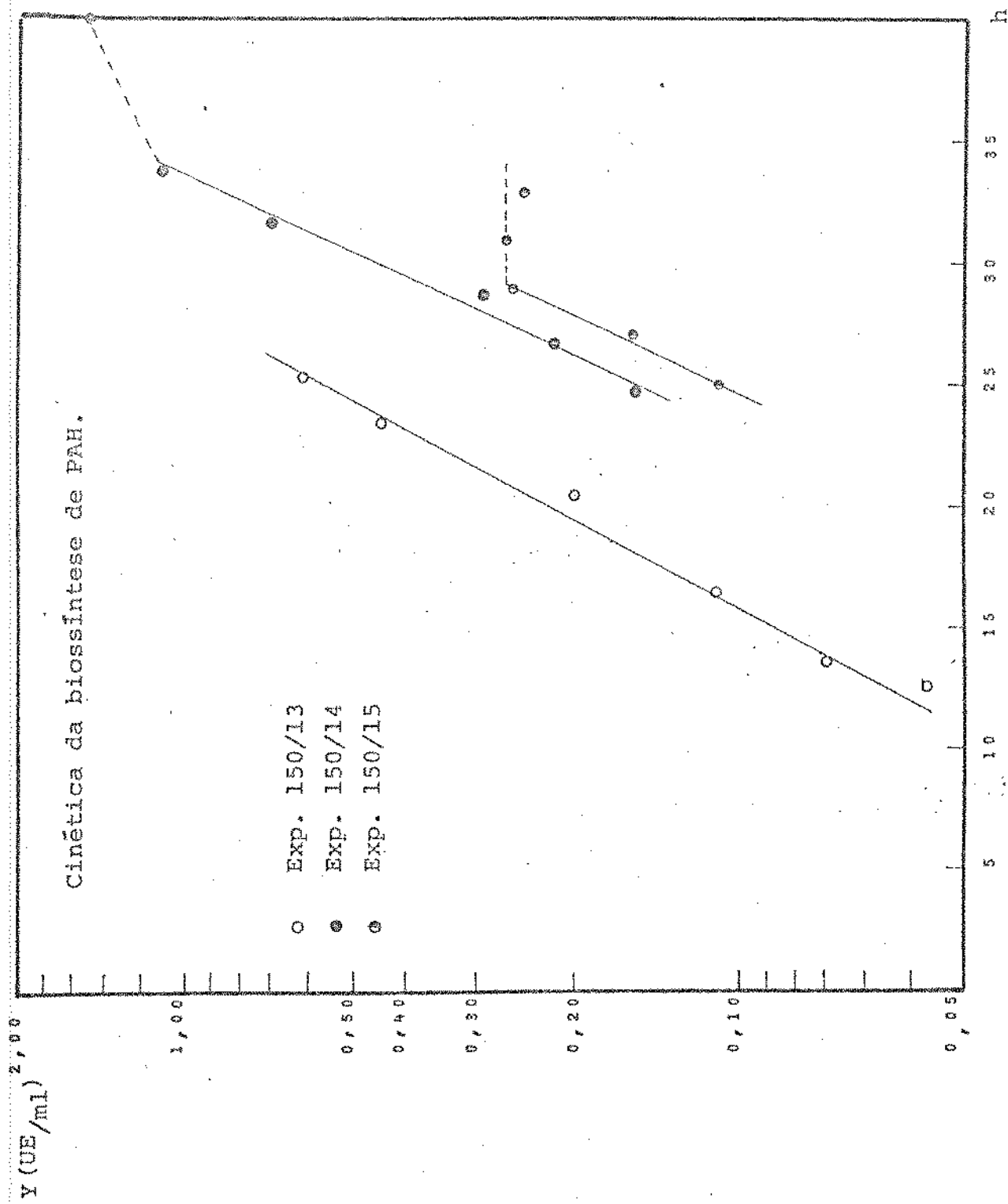


Figura 18

Modelo matemático da biossíntese de PAH

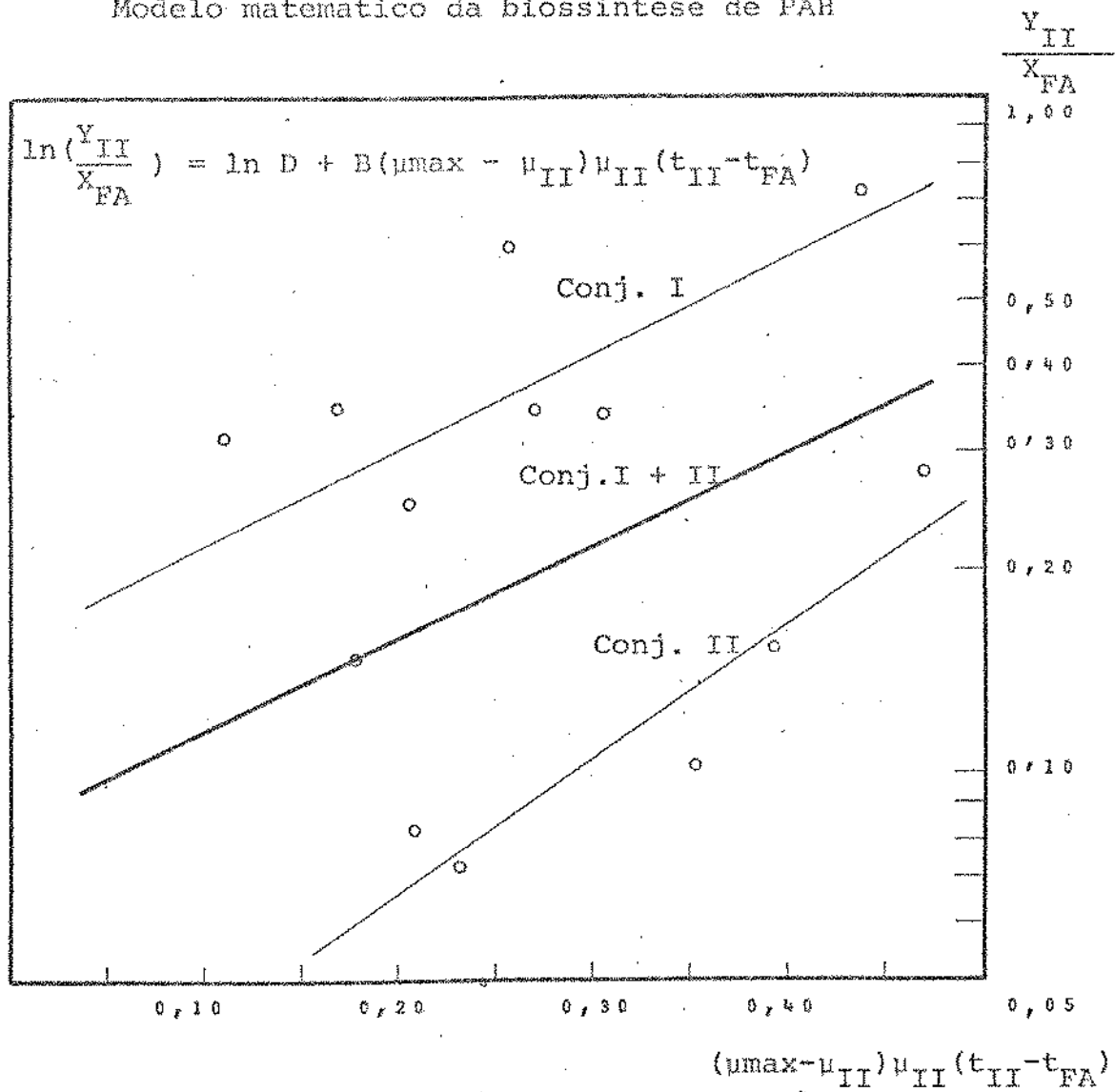


Figura 19

Modelo matemático da biossíntese da PAH

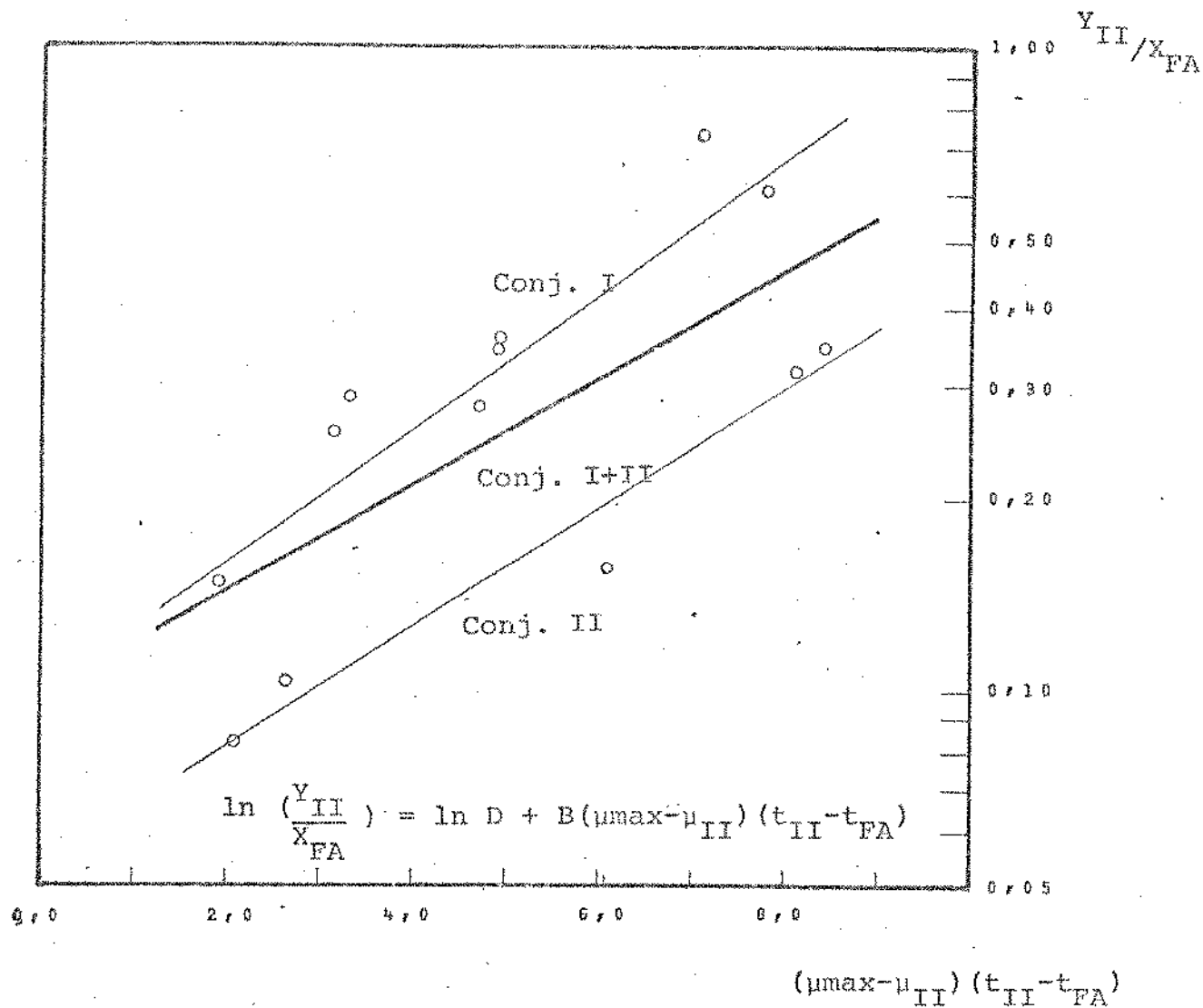


Figura 20
Análise de regressão para a correlação de Yoshida.

$$\ln \frac{X_{II}}{E^{0,666}} = 0,162 + 0,682 \ln V_{SA}$$

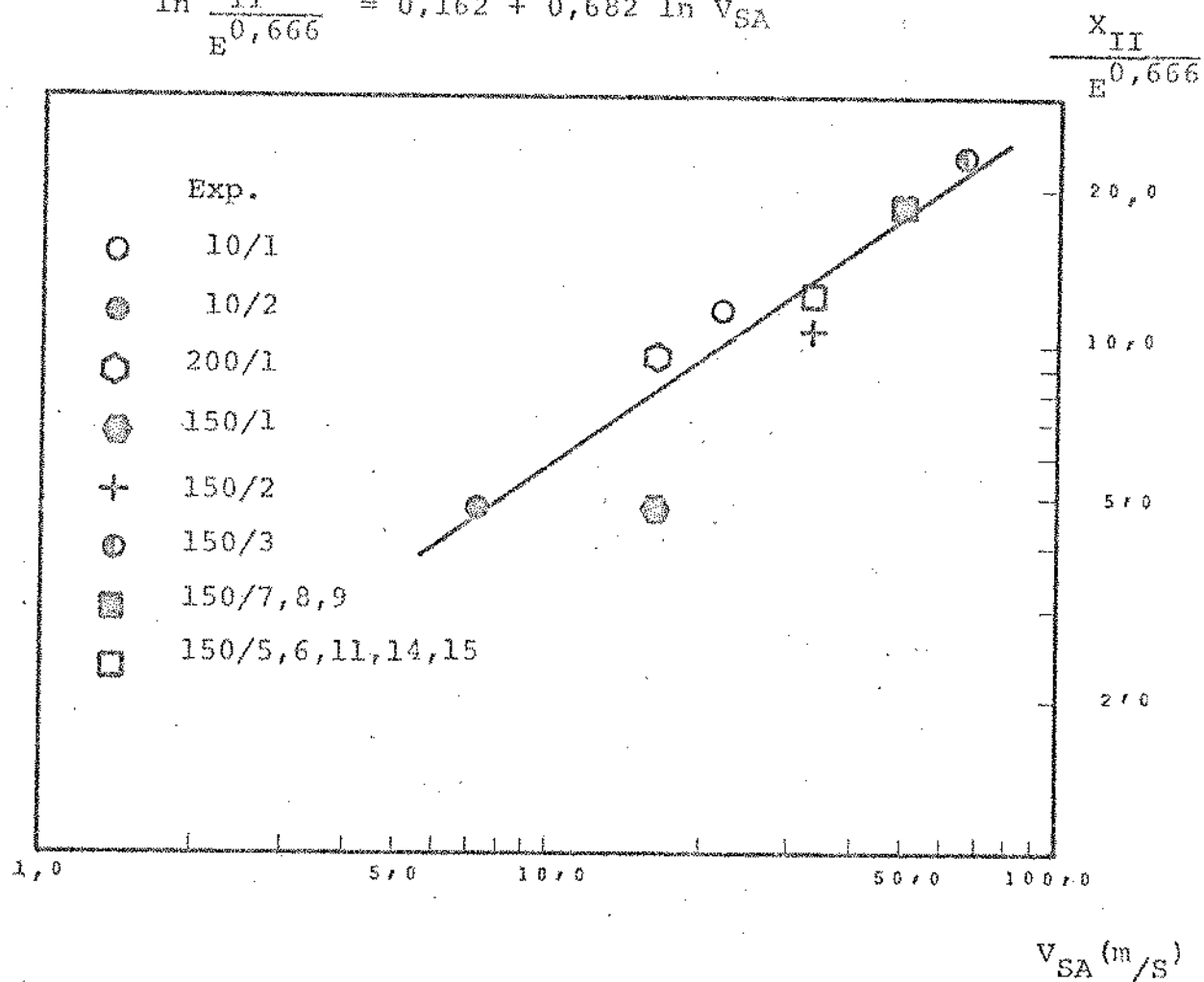
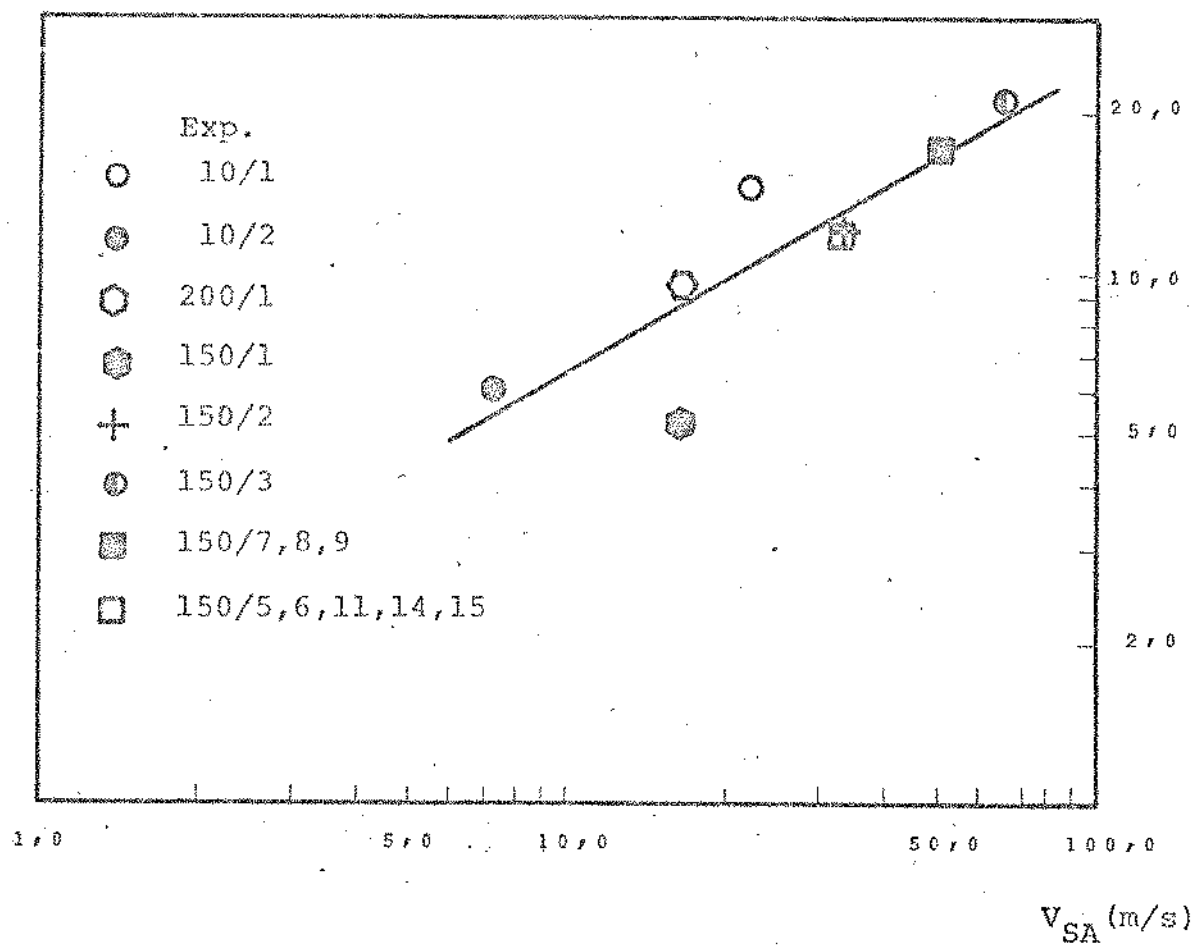


Figura 21

Análise de regressão para a correlação de Calderbank.

$$\ln \frac{X_{II}}{Eg^{0,40}} = 0,531 + 0,584 \ln V_{SA}$$

$$X_{II}/Eg^{0.40}$$



EXPERIMENTO 10/1

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Agitação : 390 rpm

Temperatura : 30°C

Vt : 0,507 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 3,0 v.v.m

Fenilacetico : 1 g/l

Vs : 0 - $1,10 \times 10^{-2}$ m/sTOD $\leq$ 5%

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Massa Celular g/l	Carbohidratos g/l	PAH UE / ml
0,00	100	-	-	-	
0,25	87	0,2	-	-	
0,75	83	0,2	-	-	
1,25	76	0,2	-	-	
1,75	63	0,2	-	-	
2,25	39	0,2	-	-	
2,75	2	0,2	0,59	12,96	
3,25	10	0,2	1,21	10,80	
3,75	2	0,6	1,49	8,24	
4,25	1	1,3	1,77	5,54	
4,75	2	2,5	2,46	4,59	
5,25	15	2,5	2,76	3,51	
5,75	2	2,5	4,07	3,65	
6,25	1	2,5	4,59	3,65	
6,75	5	3,0	5,78	3,51	
7,25	1	3,0	6,31	3,65	
7,75	2	3,0	6,58	3,38	(+)
8,25	1	3,0	6,58	3,65	
9,25	1	3,0	7,62	3,65	0,60
10,25	1	3,0	7,72	3,38	
11,25	1	3,0	9,29	3,51	
13,25	1	3,0	9,45	3,38	
15,25	2	1,8	10,48	3,24	1,60
18,25	41	1,8	10,48	-	
20,25	43	1,8	11,02	-	

EXPERIMENTO 10/2

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Temperatura : 30°C

pH : 7,0

Fenilacético : 1 g/l

TOD ≤ 5%

Agitação : 390 rpm

Vt : 0,507 m/s

Aeração : 0 - 1,0 v.v.m

Vs : 0 - 0,368 x 10⁻² m/s

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Massa Celular g/l	Carboidratos g/l	PAH UE/ml
0,00	100	-	-	-	
0,50	81	0,1	-	-	
2,00	34	0,1	1,46	-	
2,25	0	0,1	1,67	-	
2,50	30	1,0	-	-	
2,75	20	1,0	1,80	-	
3,00	0	1,0	1,73	-	
3,25	0	1,0	2,00	-	
3,50	0	1,0	2,07	-	
3,75	0	1,0	2,20	-	
4,00	0	1,0	2,33	6,27	
4,25	0	1,0	2,60	-	
4,50	0	1,0	2,67	-	
4,83	0	1,0	2,73	3,57	
5,00	0	1,0	3,00	-	
5,25	0	1,0	3,47	-	
5,50	0	1,0	3,73	-	
5,75	0	1,0	3,67	3,60	(+)
6,65	0	1,0	4,33	-	
7,98	0	1,0	4,60	-	
9,06	0	1,0	4,87	-	
10,06	0	1,0	4,80	-	0,25
12,40	0	1,0	5,33	-	0,34
21,15	0	1,0	4,80	-	
22,23	0	1,0	4,80	-	
23,23	0	1,0	5,67	3,57	
24,23	0	1,0	4,93	-	
26,89	0	1,0	5,07	-	0,35
27,29	0	1,0	5,33	-	
28,89	0	1,0	4,93	-	
29,89	0	1,0	5,40	3,65	
30,97	0	1,0	5,27	-	
32,00	0	0	4,87	-	

EXPERIMENTO 200/1 e 150/1

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Agitação : 175 rpm

Temperatura : 30°C

Vt = 0,605 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 0,5 v.v.m

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - 0,536x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

EXPERIMENTO 200/1

Hora	Aeração v.v.m	Massa Celular g/l
0,00	0,50	
3,00	0,25	
5,00	0,25	2,10
6,00	0,50	2,78
8,00	0,50	4,60
9,00	0,50	6,08
9,50	0,25	6,79
11,00	0,10	6,40
13,00	0,00	7,21

EXPERIMENTO 150/1

Hora	Aeração v.v.m	Agitação r.p.m	Massa ce- lular g/l
0,00	1,0	120	-
3,00	0,25	120	0,75
4,00	0,25	120	1,20
5,00	0,55	120	1,20
6,00	0,66	120	2,05
9,00	0,66	150	2,20
12,00	0,50	175	2,70
13,00	0,50	175	2,80
14,00	0,50	175	3,28
15,00	0,50	175	3,55
16,00	0,50	175	3,55
17,00	0,50	175	3,55
18,00	0,50	175	3,75
19,00	0,50	175	4,13

EXPERIMENTO 150/2

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Agitação máxima : 155 rpm

Temperatura : 30°C

Vt : 0,558 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 1,0 v.v.m

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

Hora	Aeração v.v.m	Agitação r.p.m	Massa celular g/l
0	-	120	-
1,00	0,10	120	-
2,00	0,10	120	1,28
5,00	1,00	120	2,65
6,00	1,00	150	4,20
7,00	1,00	150	6,00
8,00	1,00	155	6,70
9,00	1,00	155	6,80
11,00	0,75	155	6,80
12,00	0,75	155	6,25
13,00	0,50	155	7,30
14,00	0,50	155	7,70
16,00	0,25	155	7,30
17,00	0,10	155	7,08
18,00	0,10	155	7,10

EXPERIMENTO 150/3

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Agitação: 120 rpm

Temperatura : 30 °C

Vt : 0,432 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 2,0 v.v.m

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - 2,144 x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

Hora	Aeração v.v.m.	Massa celular g/l
0,00	0,20	-
2,00	0,20	-
4,00	0,50	2,75
6,00	2,00	4,73
7,00	1,20	6,40
9,50	1,50	6,80
10,50	2,00	7,40
11,50	2,00	7,85
12,50	2,00	7,95
13,50	2,00	8,00
14,50	1,50	8,28
15,50	1,33	8,43
16,50	1,33	9,05
17,50	1,33	9,45
18,50	0,10	-
19,00	0,10	-

EXPERIMENTOS 150/4 e 150/5

Condições:

Meio de cultura : N° 3

Agitação : 120 rpm

Temperatura : 30°C

Vt : 0,432 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 1,0 v.v.m.

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

EXPERIMENTO 150/4

EXPERIMENTO 150/5

Hora	Aeração v.v.m	Massa ce- lular g/l
0,00	0,10	-
3,00	0,10	0,55
6,00	0,50	-
9,00	0,50	3,25
12,00	1,00	3,50
15,00	1,00	3,95
18,00	1,00	4,80
21,00	1,00	4,52
24,00	1,00	5,45
26,00	0,10	5,60

Hora	Aeração v.v.m	Massa celu- lar g/l
0,00	0,10	-
2,00	0,10	-
4,50	0,10	0,95
7,83	0,50	3,25
11,00	1,00	3,28
14,00	1,00	3,88
17,00	1,00	4,45
20,00	1,00	4,83
23,00	1,00	5,18
25,42	0,10	5,25

EXPERIMENTOS 150/6 e 150/7

Condições:

Meio de cultura : Nº 3

Temperatura : 30°C

pH : 7,0

Fenilacético : 1 g/l

TOD ≤ 5%

Agitação : 120 rpm

Vt : 0,432 m/s

Aeração : 0 - 1,5 v.v.m

Vs : 0 - 1,608 x 10⁻²

EXPERIMENTO 150/6

Hora	Aeração v.v.m	Massa celular g/l
0,00	-	-
3,00	0,10	0,80
6,00	0,10	-
9,00	0,33	1,63
12,00	0,66	1,48
15,00	1,00	2,28
18,00	1,25	4,18
21,00	1,35	5,40
24,00	1,50	5,68
27,00	1,50	6,88
30,00	1,20	7,55
33,00	0,75	7,18
37,00	0	7,05

EXPERIMENTO 150/7

Hora	Aeração v.v.m	Massa celular g/l
0,00	-	-
3,00	0,10	-
6,00	0,30	0,65
9,00	0,50	0,70
12,00	0,50	0,78
16,00	0,75	1,48
19,00	0,75	3,65
22,00	1,15	4,58
25,00	1,50	6,08
28,50	1,50	6,00
31,00	0,75	6,40
34,00	0,50	6,43
37,00	0	6,70

EXPERIMENTO 150/8

Condições:

Meio de cultura : Nº 4

Agitação : 120 rpm

Temperatura : 30°C

Vt : 0,432 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 1.5 v.v.m

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - $1,608 \times 10^{-2}$ m/sTOD $\leq$ 5%

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Massa celular g/l
0,00	100	-	-
2,00	45	0,10	-
3,00	10	0,20	1,68
4,00	3	0,80	-
5,00	1	1,00	5,62
6,00	8	1,30	-
7,00	6	1,30	-
8,00	3	1,50	-
9,00	3	1,50	6,60
12,00	2	1,50	8,80
14,00	1	1,50	9,32
18,00	1	0,90	9,10
20,00	1	0,10	-

EXPERIMENTOS 150/9 e 150/10

Condições:

Meio de cultura : Nº 4

Agitação : 120 r.p.m.

Temperatura: 30°C

Vt : 0,432 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 1,0 v.v.m

Fenilacético: 1 g/l

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

EXPERIMENTO 150/9

Hora	Aeração v.v.m	Massa ce- lular g/l
0,00	0,05	-
3,00	0,20	-
6,00	0,20	-
9,00	0,30	3,48
12,00	0,40	4,00
15,00	0,40	4,38
18,00	0,70	4,35
21,00	0,70	-
24,00	1,00	6,25
27,00	1,00	6,48
30,00	1,00	7,83
33,00	1,00	7,23
36,00	0,60	7,75
43,00	0,10	8,09

EXPERIMENTO 150/10

Hora	Aeração v.v.m	Massa ce- lular
0,00	-	-
4,00	0,05	-
8,00	0,05	-
11,00	0,05	3,35
14,00	1,00	4,08
17,00	1,00	4,90
20,00	1,00	5,50
23,00	1,00	6,90
27,00	1,00	7,95
31,00	0,65	7,88
34,00	0,30	8,23
36,00	0,10	8,38

EXPERIMENTOS 150/11 e 150/12

Condições:

Meio de cultura : Nº 5

Temperatura : 30°C

pH : 7,0

Fenilacético : 1 g/l

TOD $\leq$ 5%

Agitação : 120 rpm

Vt : 0,432 m/s

Aeração : 0 - 1,0 v.v.m

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

EXPERIMENTO 150/11

Hora	Aeração v.v.m	Agitação rpm	Massa celu- lar g/l
0,00	-	40	-
2,00	0,25	60	-
4,00	0,45	90	1,53
9,50	0,45	120	2,18
13,50	0,45	120	2,68
17,50	1,00	120	3,20
21,50	1,00	120	4,25
25,50	1,00	120	5,13
27,50	0,80	120	5,48
31,50	0,15	120	5,05

EXPERIMENTO 150/12

Hora	Aeração v.v.m	Massa celu- lar g/l
0,00	-	-
3,00	0,30	1,95
7,00	0,30	-
10,00	0,30	2,18
13,00	1,00	2,40
16,00	1,00	2,20
19,40	1,00	2,30
22,00	0,65	2,25
25,00	0,33	2,75
28,00	0,33	2,95
31,50	0,05	2,88

EXPERIMENTO 150/13

Condições:

Meio de cultura : Nº 4

Temperatura : 30°C

pH : 7,0

Fenilacético : 1 g/l

TOD $\leq$ 5%

Agitação : 120 rpm

Vt : 0,432 m/s

Aeração : 0 - 1 v.v.m

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Massa celular g/l	PAH UE/ml
0,00	100	1,0	-	-
2,50	40	0,10	-	-
3,50	12	0,10	0,85	-
4,00	2	0,10	1,23	-
4,50	4	0,20	1,25	-
5,00	1	0,20	1,60	-
5,50	1	0,20	1,88	-
6,00	1	0,20	1,90	-
6,50	1	0,20	1,90	-
7,00	1	0,20	1,93	-
7,50	1	0,70	1,80	-
8,00	1	0,70	1,83	-
8,50	1	0,70	1,95	-
9,00	1	0,70	2,00	-
9,50	1	0,70	2,00	-
10,00	1	0,70	2,30	-
10,50	1	0,70	1,98	-
12,00	1	0,70	2,38	-
12,50	1	1,00	-	0,046
13,50	1	1,00	2,35	0,07
15,00	1	1,00	2,65	-
16,50	1	1,00	2,60	0,11
17,50	1	1,00	2,80	-
20,50	1	1,00	-	0,20
21,50	1	1,00	3,05	-
22,50	1	1,00	3,475	-
23,50	1	1,00	-	0,44
25,30	1	1,00	-	0,61

EXPERIMENTO 150/14

Condições:

Meio de cultura : Nº 4

Agitação : 50 - 120 rpm

Temperatura : 30°C

Vt : 0,180 - 0,432 m/s

pH : 7,0

Aeração : 0 - 1 v.v.m

Fenilacético : 1 g/l

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

TOD ≤ 5%

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Agitação r.p.m	Massa ce lular g/l	Carbohidra tos g/l	PAH UE/ml
0	100	1,00	120	-	7,08	-
0,75	46	0,00	50	0,70	6,95	-
1,75	30	0,25	70	-	-	-
2,75	2	0,20	100	0,78	6,30	-
4,75	2	0,20	100	0,84	4,88	-
6,75	2	0,20	100	1,08	3,98	-
8,75	2	0,20	100	1,25	3,34	-
10,75	2	0,20	100	1,40	-	-
14,75	5	0,40	100	1,63	1,48	-
16,75	7	0,25	120	1,80	0,69	-
18,75	4	0,33	120	2,15	0,67	-
20,75	1	1,00	120	2,30	0,67	-
22,75	1	1,00	120	2,75	0,62	-
24,75	1	1,00	120	2,90	0,57	0,15
26,75	1	1,00	120	3,70	0,48	0,21
28,75	1	1,00	120	4,52	0,51	0,28
30,75	1	1,00	120	4,65	-	-
33,75	1	1,00	120	-	-	1,06
36,75	1	1,00	120	4,95	-	-
39,75	2	0,50	120	4,95	-	1,30
43,75	2	0,50	120	5,78	-	-
46,75	2	0,50	120	5,93	-	-
49,75	1	0	120	5,75	-	1,30

EXPERIMENTO 150/15

Condições:

Meio de cultura : Nº 4

Temperatura : 30 °C

pH : 7,0

Penilacético : 1 g/l

TOD $\leq$ 5%

Agitação : 60 - 120 rpm

Vt: 0,216 - 0,432 m/s

Aeração: 0 - 1 v.v.m

Vs : 0 - 1,072 x 10⁻² m/s

Hora	TOD %	Aeração v.v.m	Agitação r.p.m	Massa celu lar g/l	PAH UE/ml
0,00	100	1,0	120	-	
3,00	19	0,1	60	-	
5,00	4	0,45	100	-	
7,00	2	0,45	100	0,73	
9,00	2	0,45	100	0,95	
11,00	3	0,66	110	1,45	
15,00	2	1,00	120	1,80	
17,00	2	1,00	120	2,00	
19,00	2	1,00	120	2,25	
21,00	2	1,00	120	2,60	
25,00	2	1,00	120	3,60	0,11
27,00	2	1,00	120	4,10	0,16
29,00	6	0,90	120	4,65	0,26
31,00	2	0,06	120	4,40	0,27
33,00	2	0,03	120	4,73	0,25

APÊNDICE I

Meios de cultura empregados.Meio de cultura Nº 1.

Agar nutriente - fenilacético.

Extrato de carne : 3,00g.

Peptona : 5,00g.

Agar : 15,00g.

Ácido fenilacético : 0,40g.

Água destilada qsp : 1 litro.

pH : 6,8, a 25°C.

Meio de cultura Nº 2.

Glicose : 10,00g.

Água de maceração de milho : 12,50g.

Fosfato de potássio : 6,00g.

Sulfato de magnésio heptahidratado : 0,25g.

Sulfato de cálcio dihidratado : 10^{-5} Moles.

Sulfato de cobalto heptahidratado : 10^{-5} Moles.

Sulfato ferroso heptahidratado : 10^{-5} Moles.

Sulfato de cobre pentahidratado : 10^{-5} Moles.

Sulfato de manganês monohidratado : 10^{-5} Moles.

Cloreto de zinco : 10^{-5} Moles.

Molibdato de Amônia Tetrahidratado : $1/7 \times 10^{-5}$ Moles.

Ácido fenilacético : 1,00g.

Água qsp : 1 litro.

Meio de cultura Nº 3.

Glicose : 8,00g.

Água de maceração de milho : 50,00g.

Fosfato de potássio : 12,00g.

Sulfato de magnésio heptahidratado : 0,50g.

Ácido fenilacético : 1,00g.

Cálcio, cobalto, ferro, cobre, zinco, molibdenio : 10^{-5} Moles c/u.

Água qsp : 1 litro $\pm$ 5%.

Meio de cultura Nº 4.

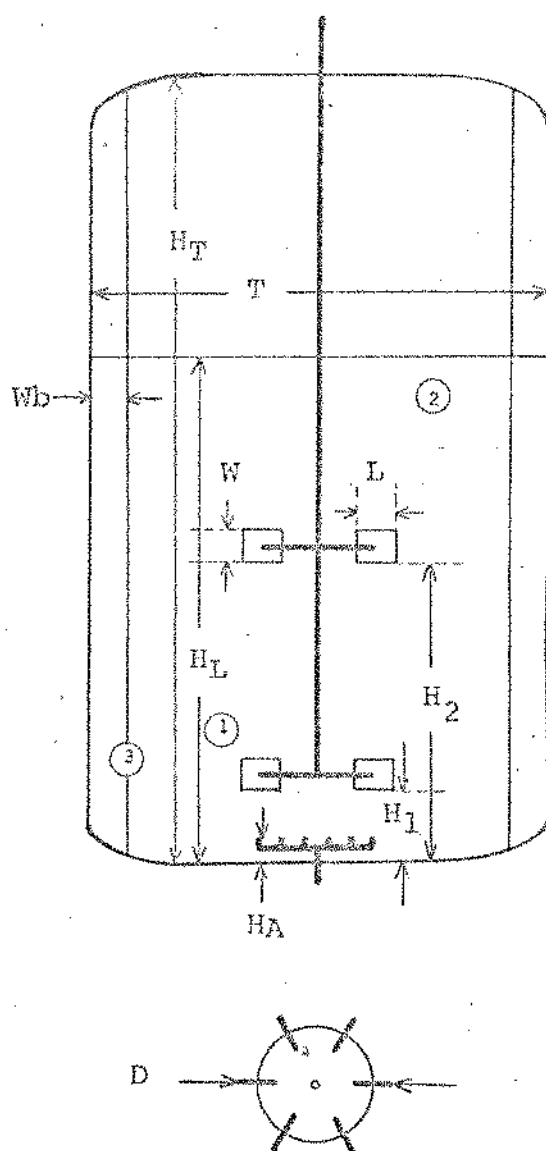
Idêntico ao meio de cultura Nº 3, com a glicose reduzida a 6,60g.

Meio de cultura Nº 5.

Idêntico ao meio de cultura Nº 3, sem adição de glicose.

Apêndice II

DIAGRAMA DO FERMENTADOR



Apêndice II - continuação

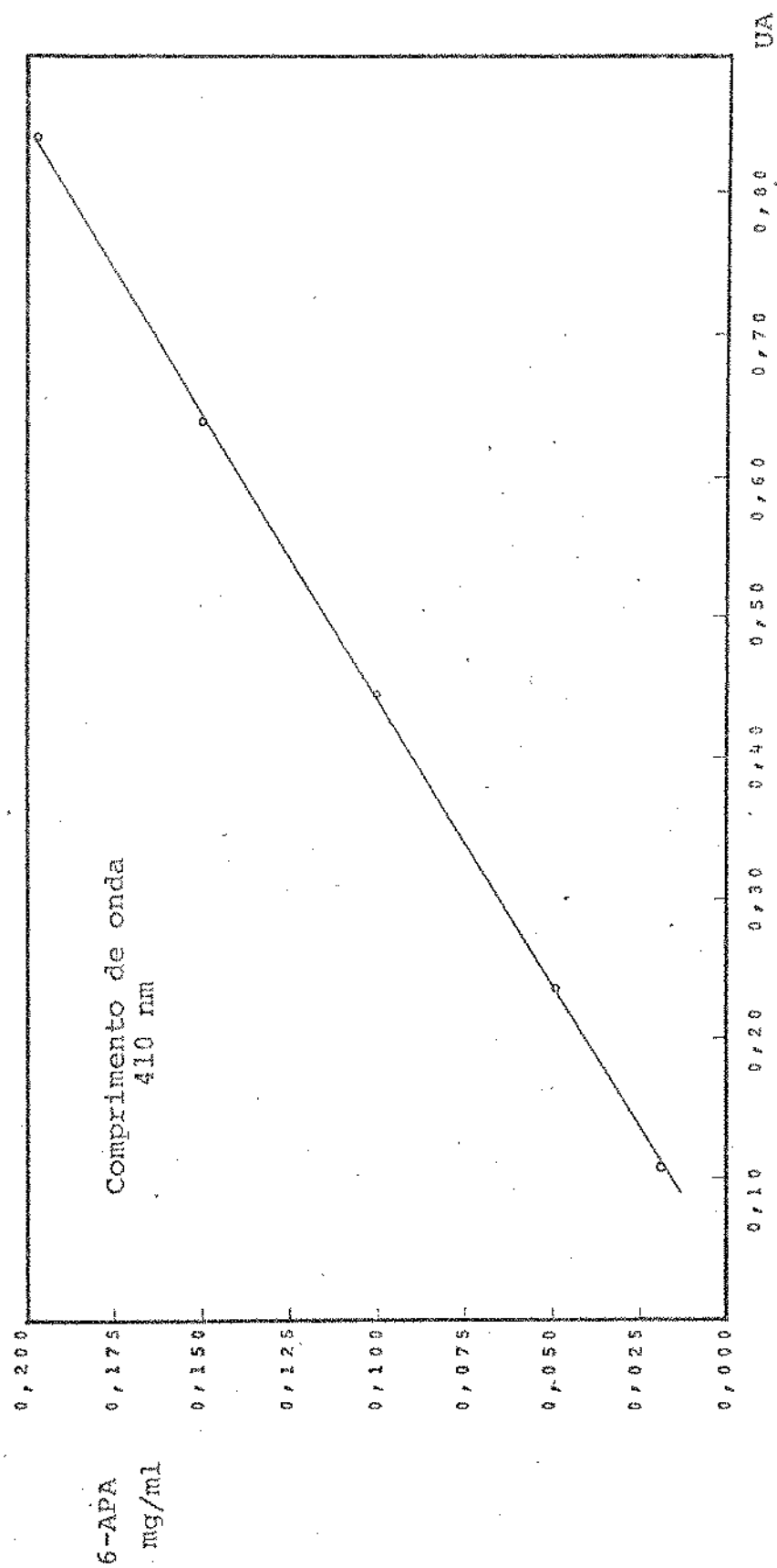
Diagrama do Fermentador .

D : diâmetro da turbina	H_T : altura do tanque
T : diâmetro do tanque	H_L : nível de líquido sem aeração
W : largura da pá	H_1 : altura da primeira turbina
L : comprimento da pá	H_2 : altura da segunda turbina
W_b : largura do defletor	H_A : altura do aspersor

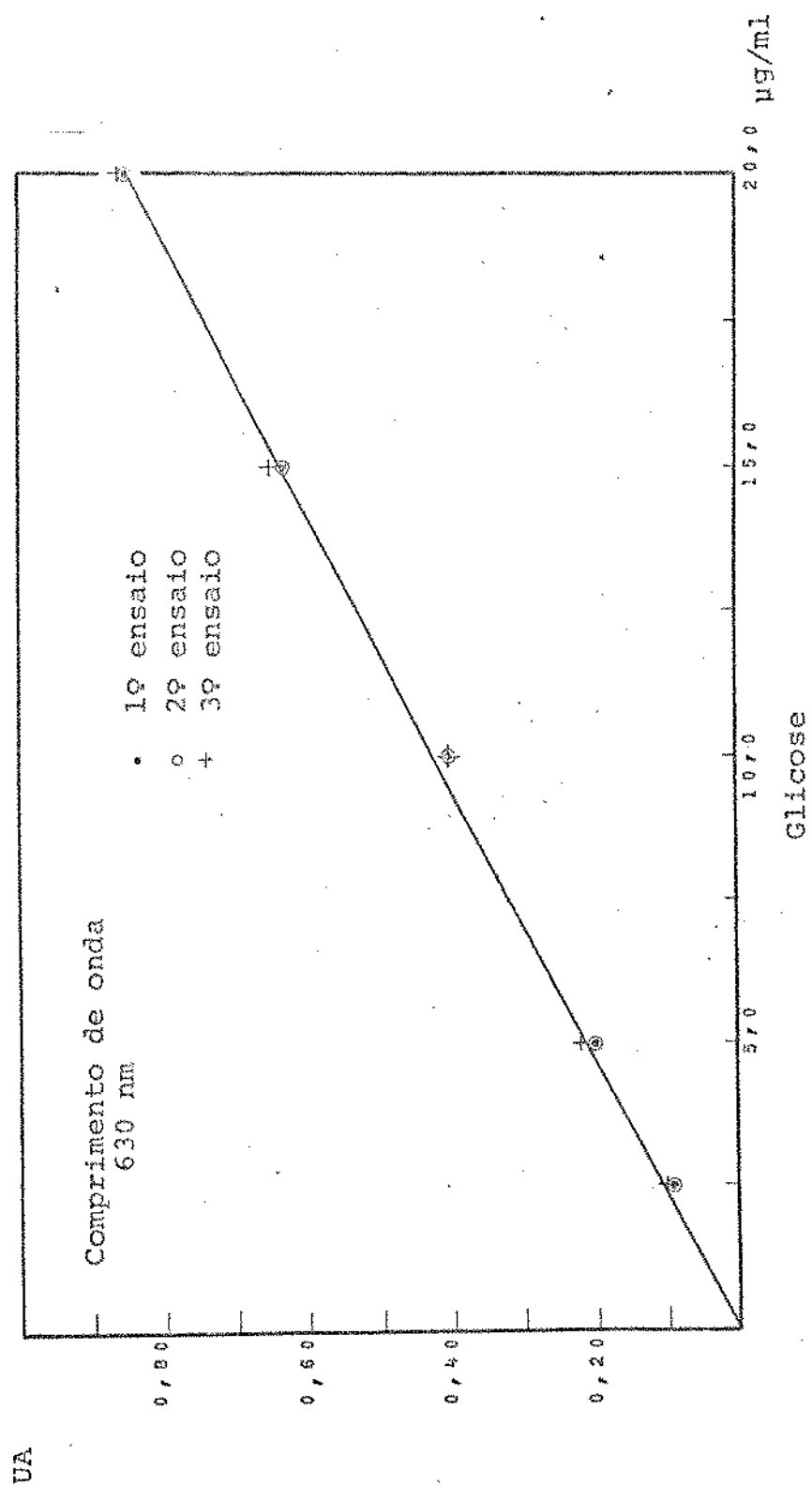
- 1: posição do eletrodo amperométrico no fermentador banco
- 2 : posição do eletrodo amperométrico no fermentador piloto
- 3 : posição do eletrodo galvânico no fermentador piloto.

Apêndice III, Figura 1

Curva padrão para determinação de 6-APA



Apêndice III, figura 2

Curva padrão de glicose

NOMENCLATURA

- a : área interfacial (m^{-1})
 B : fator de conversão da TOD em concentração de oxigênio dissolvido (mm de O_2/l) ou parâmetro da equação da cinética de produção de PAH.
 C : constante
 C_I, C_{II} : parâmetros da equação da cinética de crescimento
 D : diâmetro da turbina (m) ou parâmetro da equação da cinética de produção de PAH
 D_o : diâmetro dos orifícios do distribuidor de ar (m)
 D_{SM} : diâmetro médio de Sauter (m) de uma dispersão, dado pela relação entre o volume total e a área total da fase dispersa.
 exp : exponencial
 E : potência unitária (m^2/s^3)
 E_g : potência unitária com aeração (m^2/s^3)
 $E_1, E_2, \dots, E_i \dots E_m$: concentração de nutrientes essenciais na equação da cinética de crescimento
 F : fator de potência na equação $E = \frac{F D^5}{T^2 HL}$
 FA : ácido fenilacético
 g : aceleração da gravidade (m/s^2)
 H_A : altura do distribuidor medida do fundo do fermentador (m)
 H_I : altura da primeira turbina (m)
 H_2 : altura da segunda turbina (m)
 H_L : nível de líquido (m)
 H_T : altura total do fermentador (m)
 J : parâmetro na equação do coeficiente volumétrico de transferência de massa ($m^{-2m-n} s^{-3m-n-1}$)
 k_l : coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida (m/s)
 k_{la} : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida (s^{-1}) ou (h^{-1})
 $k_1, k_2 \dots k_i \dots k_n$: constantes da equação de Michaelis-Menten
 K : índice de consistência ($\frac{dyna}{cm^2} s^{1,54}$) ou parâmetro da corre-

lação de Pharamond

$K_1, K_2, \dots, K_i, \dots, K_n$: constantes da equação de Michaelis-Menten

$K_{E1}, K_{E2}, \dots, K_{Ei}, \dots, K_{Em}$: constantes da equação de Michaelis-Menten

K_I, K_{II} : constantes da equação de Michaelis-Menten

l : fase líquida

L : comprimento das pás da turbina

$\ln$: logaritmo neperiano

m : expoente de $E, E_g, P/V$ ou P_g/V

m_o : número de orifícios do distribuidor

n : índice de comportamento reológico ou expoente de V_s ou V_{SA} .

N : velocidade de rotação do agitador (r.p.m) ou (s^{-1})

N_p : número de potência

Ox : concentração de oxigênio dissolvido (mM de O_2/l)

Ox^* : concentração de oxigênio dissolvido de saturação a T e P

Ox_I : concentração de oxigênio dissolvido no qual se produz a mudança na cinética

Ox_{II} : concentração de oxigênio limite para crescimento celular

P : pressão (kg/cm^2)

P : potência (W)

P_g : potência com aeração (W)

P/V : potência por unidade de volume (W/m^3)

P_g/V : potência por unidade de volume com aeração (W/m^3)

PA : para análise

PAH : penicilinamidahidrolase

PQ : pureza química

q : demanda específica de oxigênio (mM de O_2/g de células)

q_I, q_{II} : demanda específica de oxigênio no primeiro e segundo período

$Qv.v.m$: vazão de ar, em volume de ar por volume de meio por minuto.

V : volume de meio (m^3)

V_t : velocidade tangencial do agitador (m/s)

V_s : velocidade do ar associada com a secção transversal do fermentador

- tador (m/s)
- V_{SA} : velocidade do ar associada com a secção total dos orifícios do distribuidor.
- W : largura das pás da turbina
- W_D : largura dos defletores
- X : massa celular (g/l em base seca)
- X_0 : massa celular inicial (g/l em base seca)
- X_I : massa celular quando se produz a mudança cinética
- X_{II} : massa celular final
- y : produção de PAH (UE/mg)
- y_{II} : produção de PAH final (UE/mg)
- Y : produção de PAH (UE/ml)
- Y_{II} : produção de PAH final (UE/ml)
- r : coeficiente de correlação
- r.p.m : rotações por minuto
- S : secção transversal do fermentador (m^2)
- S : desvio padrão
- SA : área total dos orifícios do distribuidor (m^2)
- $S_1, S_2 \dots S_i \dots S_n$: concentração de nutrientes estimulantes na equação da cinética de crescimento.
- T : diâmetro do fermentador (m) ou temperatura absoluta
- t : tempo (s) ou (h)
- t_c : tempo de circulação (s)
- t_I : tempo no qual se produz a mudança cinética (h)
- t_{II} : tempo total para atingir X_{II} (h)
- t_{FA} : tempo em que se adicionou o fenilacético (h)
- TDO: taxa de demanda de oxigênio do meio de fermentação (mM de O_2/lh)
- TOD : tensão de oxigênio dissolvido
- TTO: taxa de transferência de oxigênio ao fermentador (mM de O_2/lh)
- (TTO)max : valor máximo que atinge a TTO
- Letras gregas
- μ : velocidade específica de crescimento (h^{-1})
- μ_I : velocidade específica de crescimento no primeiro período

- μ_{II} : velocidade específica de crescimento no segundo período
 μ' : valor máximo da contribuição à velocidade específica de crescimento provocada pelo oxigênio no primeiro período.
 μ_{max} : máximo valor de μ
 ρ : densidade (Kg/m^3)
 σ : tensão superficial ($\frac{\text{Newton}}{\text{m}}$)
 ϕ : função ou fração em volume da fase dispersa
 γ : taxa de cisalhamento (s^{-1})
 τ : tensão de cisalhamento (dina/cm^2)
 α : proporcional a

B I B L I O G R A F I A

1. AIBA, S., HUMPHREY, A.E. and MILLIS, N.F. Biochemical Engineering. New York, Academic Press, 1973. 433p.
2. ACEVEDO, F. and COONEY, C.L. Penicillin amidase production by *Bacillus megaterium*. Biotech. and Bioeng., 15: 493, 1973.
3. BATES, R., FONDY, P.L. and CORPSTEIN, R. An examination of some geometric parameters of impeller power. Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., 2(4):310, 1963.
4. BATES, R., FONDY, P.L. and FENIC, J.G. Impeller characteristics and power. In: Mixing. Theory and Practice. Uhl V.W. and Gray, J.B., editors. New York, Academic Press, 1966. V.1, Cap. 3, p.112.
5. BATES, R. In: Biochemical and Biological Engineering Science. Blakebrough, N., editor. New York, Academic Press, 1967. V.1, Cap. 5, p. 127.
6. BAUER, S. and SHILOACH, J. Maximal exponential growth rate and yield of *E. coli* obtainable in a bench scale fermentor. Biotech. and Bioeng., 16: 933, 1974.
7. BLASINSKI, H. and RZYSKI, E. The mixing of non-newtonian liquids part I. Selected problems. Int. Chem. Eng., 12 (1) : 24, 1972.
8. BORKOWSKI, J.D. and JOHNSON, M. V. Long-lived steam-sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. Biotech. and Bioeng., 9:635, 1972.

9. BROWN, D.E. and PITT, K. Drop size distribution of stirred non-coalescing liquid-liquid system. Chem. Eng. Sci., 27:577, 1972.
10. _____. Effect of impeller geometry on drop break-up in a stirred liquid-liquid contactor. Ibid, 29 : 345, 1974.
11. CALDERBANK, P.H. Mass Transfer in Fermentation Equipment In: Biochemical and Biological Engineering Science. Blakebrough, N., editor. New York, Academic Press, 1967 VI, Cap. 5, p.102.
12. _____. Physical rate process in industrial fermentation. Part I : The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. Trans. Instn. Chem. Engrs., 36:443 , 1958.
13. _____. Physical rate process in industrial fermentation. Part II : Mass transfer coefficients in gas-liquid contacting with and without mechanical agitation. Ibid, 37 : 173, 1959.
14. _____ and MOO-YOUNG, M.B. The power characteristics of agitators for the mixing of newtonian and non-newtonian fluids. Ibid, 39 : 338, 1961.
15. CARRINGTON, T.R., SAVIDGE, T.A. and WALMSLEY, M.F. U.S. Patent 3.298.924. Jan. 17, 1967.
16. COLE, M. Properties of the penicillin deacylase enzyme of E. coli. Nature, 203(4944) : 519 , 1964.
17. _____. Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of E. coli. Biochem. J., 115 : 733, 1969.

18. COOPER, C.M., FERNSTROM, G.A. and MILLER, S.A. Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36 (6) : 504 (1944).
19. DANIEL, C. and WOODS, F.S. Fitting Equations to Data. New York, Wiley Interscience. 1971. 342p.
20. GOTOVTSEVA, V.A. and LEVITOV, M.M. Comparative investi-
gation of penicillinacylase biosynthesis in cultures
Bacillus faecalis alcaligenenes N 415 and Escherichia
coli N 9637. In:Antibiotics-Advances in Research, Pro-
duction and Clinical Use. Herold, M. and Gabriel, Z.,
Editors. London, Butterworths. 1966, p.505.
21. GRAY, P.P., DUNNILL, P. and LILLY, M.D. Kinectics of
8-galactosidade production by a constitutive mutant of
Escherichia coli. J. Ferment. Technol., 50 (6) :381,
1972.
22. HART, F.L. and FISHER, H.J. Modern Food Analysis.
New York, Springer Verlag, 1971. p.417.
23. HOSPODKA, J. Oxygen-absorption rate-controlled feeding
of substrate into aerobic microbial cultures. Biotechnol.
and Bioeng., 8 : 117, 1966.
24. HUANG, H.T. et all. Enzymatic hidrolisis of the side chain
of penicillins. J. Amer. Chem. Soc., 82(7):3790, 1960.
25. HUBER, F.M. et all. Preparative Methods for 7-aminoce -
phalosporanic acid and 6-aminopenicilanic acid. In:Ce
phalosporins and Penicillins. Chemistry and Biology.
Flynn, E.H., editor. New York, Academic Press. 1972.
Cap. 2, p.27.

26. HYMAN, D. Mixing and Agitation. In: Advances in Chemical Engineering. Drew, T.B. , editor. New York, Academic Press. 1962. cap.3 , p. 167.
27. KAUFMANN, W.K. and BAUER, K. In: Cephalosporins and Penicillins. Chemistry and Biology. Flynn, E.H., Editor New York, Academic Press, 1972. Cap. 2, p.31.
28. KLEINER, G.I. e LOPATNEV, S.V. Effect of aeration and agitation on production of penicillinacylase in submerged culture of Escherichia coli. In: Advances in Microbial Engineering. Sikyta, B., Prokop, A. and Novak, M., editors. New York, J. Wiley and Sons. 1973. VI, p. 241.
29. LEVITOV, M.M. et all. The formation of penicillin acylase in Escherichia coli in dependence on cultivation conditions. In: Antibiotics-Advances in Research, production and clinical use. Herold, M. and Gabriel, Z. editors. London, Butterworths, 1966. p.501.
30. LOUCAIDES, R. and Mc MANAMEY, W.J. Mass transfer into simulated fermentation media. Chem. Eng. Sci. 26 :461, 1971.
31. MEHTA, V.D. and SHARMA, M.M. Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. Chem. Eng.Sci. 26 : 461, 1971.
32. MICHEL, B.J. and MILLER, S.A. In: AIBA, S., HUMPHREY, A.E. and MILLIS, N.F. Biochemical Engineering. New York Academic Press, 1973. Cap. 6, p.176.
33. MILLER, D.N. Liquid film controlled mass. Ind. Eng. Chem., 56 (10) : 18, 1964.

34. _____ Scale-up of agitated vessels mass transfer from fixed solute surfaces. Chem. Eng. Sci., 22 :1617,1967
35. _____ Scale-up of agitated vessels gas-liquid mass tranfer. AICHE Journal, 20 (3) : 445, 1974.
36. MLYNEK, Y. and RESNICK, W. Drop sizes in an agitated li quid-liquid system. AICHE Journal, 18 (1) : 122,1972.
37. OHYAMA, Y. and ENDOH, K. In : AIBA, S., HUMPHREY, A.E. and MILLIS, N.F. Biochemical Engineering. New York, Academic Press, 1973. Cap. 6, p.175.
38. OLDSHUE, J.Y. Fermentation mixing scale up techniques Biotech. and Bioeng., 8 : 3, 1966.
39. PARK, J.Y. and BLAIR, L.M. The effect of coalescence on drop size distr-bution in an agitated liquid-liquid dispersion. Chem. Eng. Sci., 30 : 1057, 1975.
40. PEREZ, J.F. and SANDALL, O.C. Gas absorption by non-new toniam fluids in agitated vessels. AICHE Journal,20 (4) : 770, 1974.
41. PHARAMOND, J.C., ROUSTAN, M. and ROQUES, H. Determination de la puissance consommée dans une cuve aerée et agi - tée. Chem. Eng. Sci., 30: 907, 1975.
42. PRASHER, B.D. Mass transfer coefficients and interfacial areas in agitated dispersions. AICHE Journal,21 (2): 407, 1975.
43. PRUESS, D.L. and JOHNSON, M.V. Enzymatic deacylation of S-35 benzypnicillin. J. of Bacteriol, 90 (2):380, 1965.

44. PRICE, K.E. Structure Activity Relationships of Semisynthetic Penicillins. In: Advances in applied microbiology. Perlman, D., editor. New York, Academic Press. 1969. V.11. p.17.
45. ROLINSON, G.N., et all. Formation of 6-aminopenicilanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. Nature, 187 (4733) : 236, 1960.
46. RYU, D.Y. and HUMPHREY, A.E. A reassessment of oxygen - transfer rates in antibiotics fermentations. J. Ferment. Technol., 50 (6) : 424, 1972.
47. SACCANI, F. and PITROLO, G. Determinazione simultanea della benzilpenicillina e dell'acido 6-aminopenicilánico nei brodi di fermentazione. Boll Chim.Farm., 108 (89) : 324, 1969.
48. SELF, D.A., KAY, G. and LILLY, M.D. The conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillinamidase. Biotech. and Bioeng., 11 : 337, 1969.
49. SHINNAR, R. and CHURCH, J.M. Predicting particle size in agitated dispersions. Ind. Eng. Chem., 52 (3) : 253, 1960.
50. SIDEMAN, S., HORTACSU, O. and FULTON, J.W. mass transfer in gas-liquid contacting systems. Ind. Eng. Chem., 58 (7) : 32, 1966.
51. SIKYTA, B. and SLEZAK, J. continuous cultivation of Escherichia coli possessing high penicillin-acylase activity. Biotech. and Bioeng., 6 : 309, 1964.

52. SILVA, R.S.S.F. Produção de Riboflavina por Fermentação com *Eremothecium ashbyii*. Campinas, 1973 (tese, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - UNICAMP).
53. SMITH, C.L., PIKE, R.W. and MURRILL, P.W. Formulation and Optimization of Mathematical Models. Pennsylvania, International Textbook Company, 1970. 581p.
54. SZENTIRMAI, A. Studies of penicillin acylase from *Escherichia coli*. In: Antibiotics - Advances in Research, production and clinical use. Herold, M. and Gabriel, Z., editors. London, Butterworths, 1966. p.529.
55. TAKEBE, H., TAKAHASHI, J. and UEDA, K. Enlargement of the culture scale from flask to jar fermenter in the production of ribonuclease N1 by *Neurospora crassa*: effect of agitation intensity on enzyme production. J. Ferment. Technol., 49 (12) : 989, 1971.
56. TSAO, G.T. and HANSON, T.P. Extended monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. Biotech. and Bioeng., 17 : 1591, 1975.
57. UEDA, K., TAKEBE, H., TAKAHASHI, J. and NOMOTO, M. Enlargement of the culture scale from flask to jar fermenter in the production of ribonuclease N1 by *Neurospora crassa*: Combined effect of dissolved oxygen and agitation on enzyme production. J. Ferment. Technol., 49 (12) : 981, 1971.
58. VANDAMME, E.J. and VOETS, J.P. Microbial Penicillin Acylases. In: Advances in Applied Microbiology. Perlman, D. editor. New York, Academic Press, 1975. V17, p.311
59. VOJKTISEK, V. and SLEZAK, J. Penicillinamidohidrolase in

Escherichia coli I - Substrate Specificity. Folia Microbiol., 20 (3) : 224, 1975.

60. _____ Penicillinamidohidrolase in Escherichia coli II. Synthesis of the enzyme, kinetics and the effect of O_2 . Ibid, 20 (4) : 289, 1975.
61. WANG, D.I.C. and HUMPHREY, A.E. Developments in agitation and aeration of fermentation systems. In :Progress in Industrial Microbiology. HOCKENHULL, D.J. Editor. London, J. and A. Churchill Ltd, 1968 V.8,p.1.
62. WESTERTEP, K.R., VAN DIERENDONCK, L.L. and DE KRAA, J.A. Interfacial areas in agitated gas-liquid contactors Chem. Eng. Sci., 18 : 457, 1963.
63. _____ Design of agitators for gas-liquid contacting. Chem. Eng. Sci., 18 : 495, 1963.
64. YOSHIDA, F., IKEDA, A., IMAWAKA, S. and MIURA, Y. Oxygen absorption rates in Stirred gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem., 52 (5) : 435, 1960.
65. _____ and MIURA, Y. Gas absorption in agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., 2 (4) : 263 , 1963.

A G R A D E C I M E N T O S

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP pela ajuda concedida em equipamentos, laboratórios e mão de obra.

À Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos pela ajuda econômica dispensada.

Ao Dr. Fumio Yokoya, pela orientação e estímulo.

Ao Dr. André Tosello, Diretor da F.E.A.A. pelo interesse com que acompanhou esta pesquisa.

Aos Engenheiros Enny Martucci, Sergio Dall'oca e Iracema Nakamura e aos estudantes Nilo S.S. Rodrigues e Luis E. Maturano que colaboraram na realização deste trabalho.

Aos Técnicos de Laboratório Maria Isabel Rodrigues, Fátima Aparecida de Almeida, Antonio Quirino Simões e Wilson Sammi Cury pelos serviços prestados.