

660

7 0 0 1 1 5 2

**ESTUDO DE UM FERMENTADOR PARA
 PRODUZIR PROTEÍNAS DOS DERIVADOS
 DO PETRÓLEO**

Eng^o Químico RICARDO SADIR

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

O. E. A.	
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	
— CURSO REGIONAL —	
N.º	660.283-5152 00
Data *	4 DEZ 1971

Campinas, São Paulo
1969

**À minha esposa Mercedes
e aos meus filhos.**

CONTEÚDO

I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1 - Principais matérias-primas	5
2 - Purificação da proteína microbiana	7
3 - Possibilidades econômicas	7
4 - Cultivo de bactérias em metano	7
5 - Cultivo de leveduras em óleo de gás	9
III - TRABALHO EXPERIMENTAL	11
1 - Equipamentos	11
2 - Eficiência dos equipamentos desenhados- transferência de massa de oxigênio	15
3 - Equipamentos e sistemas de agitação testados..	20
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
V - CONCLUSÕES	44
VI - RESUMO E "SUMMARY"	45
VII - LITERATURA	46
VIII - AGRADECIMENTOS	54

I - INTRODUÇÃO

A produção de proteínas microbianas por oxidação dos hidrocarbonetos representa, na atualidade, um extraordinário problema tecnológico e econômico. Muitas empresas petrolíferas das várias partes do mundo, estão realizando estudos técnico-econômicos para determinar se é factível a utilização dos hidrocarbonetos para a produção de proteínas em escala comercial. Do ponto de vista da engenharia, isso requer o projeto do processo de fabricação, o desenho e a construção de equipamentos especiais.

Esses equipamentos devem ter a capacidade para poder pôr em contacto os derivados do petróleo com o microrganismo, pois os hidrocarbonetos não se dissolvem em água. Os equipamentos de fermentação normalmente usados para produzir proteínas microbianas a partir de carboidratos como matéria-prima, não podem ser usados com êxito com hidrocarbonetos, visto que, neste caso, o oxigênio requerido e a transferência de massa do oxigênio devem ser muito maiores que no primeiro caso.

O objetivo principal deste trabalho é o de apresentar o cálculo, estudo, projeto e desenho de um fermentador específico para ser usado na produção de proteínas de derivados do petróleo, com a finalidade de resolver os problemas acima mencionados. Portanto, foi necessário estudar os fatores dos quais depende a transferência de oxigênio para se conseguir os valores adequados de oxidação, baseados na determinação pelo "Método do Sulfito".

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É indiscutível que a cultura microbiana em hidrocarbonetos produzirá um impacto nos problemas da alimentação mundial (1). A cada 40 anos, a população mundial duplica-se, e embora alguns países disponham de suficiente produção agrícola para alimentar suas populações, em outros, elas sofrem de fome. Mesmo nos países tipicamente agrícolas, prevê-se que os excessos irão desaparecer nos próximos 20 ou 30 anos, a menos que haja um controle da natalidade.

As proteínas microbianas tomaram um papel importante na alimentação humana, como mostram os dados do quadro 1, no qual a duplicação da massa de vários produtos agrícolas é comparada com a de microrganismos e outros. O ponto mais importante a observar é que alguns microrganismos têm uma vantagem de crescimento até 500 vezes maior que o de alguns produtos agrícolas e 10.000 vezes maior que o do gado.

Quadro 1. Tempo para duplicação da massa em vegetais e animais.

Organismos	Tempos de duplicação
Leveduras e bactérias....	20 - 120 minutos
Algas	2 - 48 horas
Produtos agrícolas (alfafa, p. ex.)	1 - 2 semanas
Frangos	2 - 4 semanas
Porcos	4 - 6 semanas
Gado	1 - 2 meses

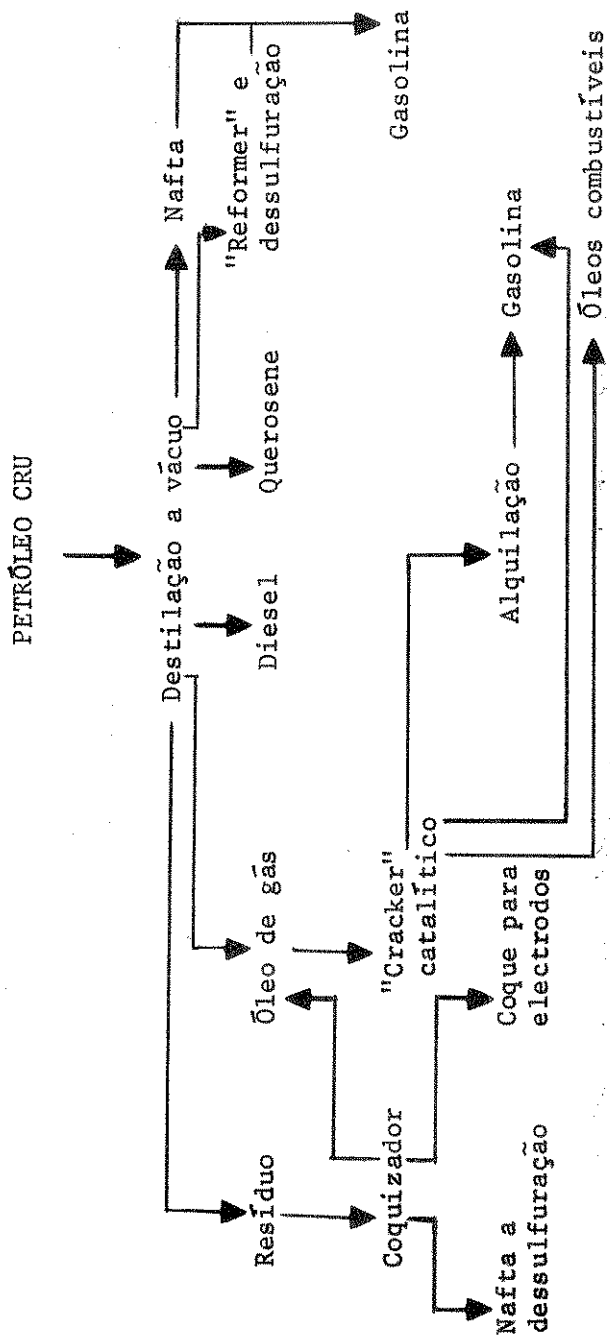


Fig. 1. Principais derivados do petróleo (2).

A principal limitação ao uso de alimentos microbianos, está no gosto e na textura. Quando se usam hidrocarbonetos como matéria-prima, além do aspecto da aceitabilidade, surge o problema toxicológico. Na purificação da proteína de levedura obtida de derivados do petróleo, deve-se eliminar até os últimos vestígios de hidrocarbonetos, pois, caso contrário, o microrganismo irá concentrar uma alta proporção de purina e piridina, o que limitará o seu uso na dieta humana a uma quantidade abaixo de 100 g/dia/pessoa (34).

Já era fato conhecido que os derivados de petróleo são, às vezes, atacados por vários tipos de microrganismos, sabendo-se, agora, que estes podem utilizar os derivados do petróleo para produzir proteínas alimentícias, ou seja, proteínas que podem ser empregadas na alimentação humana e animal. De todos os derivados do petróleo, com os principais indicados na figura 1, o óleo de gás e o querosene são os mais usados para a produção de proteínas, além do gás natural obtido na pesquisa geológica do petróleo.

Apesar de a produção de proteínas microbianas do petróleo ser similar àquela de proteínas dos carboidratos, o bioquímico deve enfrentar, no primeiro caso, problemas mais difíceis que no segundo, tais como: colocar o microrganismo em contacto com os derivados do petróleo para produzir sua oxidação e degradação, pois os hidrocarbonetos não se dissolvem na água (solubilidade limitada); e, com exceção dos componentes gasosos de baixo peso molecular (62), possivelmente necessitem ser emulsionados antes de poderem ser oxidados pelos microrganismos.

Para que os microrganismos ataquem os derivados do petróleo, é preciso que estes se encontrem na presença de água. Como o querosene e os combustíveis mais pesados têm tendência a reter a água e a formarem emulsões mais rapidamente que os combustíveis leves, tais como a gasolina, explica-se a dificuldade de se encontrar deterioração microbiana na gasolina imobilizada, ao passo que é fácil encontrá-la no óleo

de gás, querosene, diesel, óleos combustíveis e combustíveis de avião a jato (10, 20, 28, 42, 43, 55, 62, 63), sendo que, estes últimos, são os derivados do petróleo mais adequados para a produção de proteínas microbianas.

Os principais microrganismos utilizados para produzirem proteínas dos derivados do petróleo compreendem: fungos (*Cunninghamella blakesleena*) (C10 - C18) (2); bactérias termofílas (45 - 70°C) (C14 - C16) (32); *Pseudomonas methanica* (metano); leveduras (*Torula utilis*, *Candida intermedia* e *C. lipolytica*) (óleo de gás, querosene). As *Pseudomonas* mais empregadas são: *P. methanitricans* e *P. methanica*.

Diversas firmas comerciais e instituições, em várias partes do mundo, estão pesquisando e trabalhando nesse sistema de produção de proteínas. Na Rússia já existe pelo menos uma planta industrial produzindo 15 toneladas diárias de células protéicas de hidrocarbonetos (70). As seguintes instituições estão trabalhando, direta ou indiretamente, em escala-piloto, na produção de proteínas do petróleo (70): Standard Oil; Mobil Oil; Shell Oil; Gulf Oil; Phillips Petroleum; Sun Oil; The American Institute of Gas Technology; Massachusetts Institute of Technology; British Petroleum; Institut Français des Petroles; Imperial Chemical Industries; Chinese Petroleum Corp.; outras na Rússia, Japão etc.

1. Principais matérias-primas

Os principais derivados do petróleo utilizados para a produção de proteínas microbianas são: metano, óleo de gás e n-alcenos parafínicos. Além dos hidrocarbonetos, é necessária a adição de outros elementos nutritivos para o microrganismo poder sintetizar proteínas, tais como: amônio, potássio, magnésio, fosfatos, cloretos, sulfatos e traços de outros sais minerais (70).

a) Metano. Essa matéria-prima tem a vantagem do baixo custo, dando células microbianas claras, fáceis de purificar. Os hidrocarbonetos líquidos são mais caros e produzem células mais escuras e mais difíceis de purificar. O principal problema do metano é a inflamabilidade e o seu poder explosivo, quando misturado com o ar, além de certos limites. Por isso, a composição química da mistura deve se manter além dos limites de inflamabilidade e explosão (70). Quando se usa metano como matéria-prima, os equipamentos devem ser construídos à prova de explosão, isto é, os motores, instrumentos elétricos, instalações elétricas etc., devem ser protegidos contra a explosão.

De uma tonelada de metano, obtêm-se, normalmente, 600 quilos de células microbianas secas, com 55-60% de proteína, isto é, o correspondente a cerca de 345 quilos de proteína seca (69). Os microrganismos obtidos do metano contêm todos os aminoácidos que aparecem na torta de soja, com exceção da cistina, isoleucina e triptofano (18, 69, 70).

b) Óleo de gás e querosene. Óleo de gás contém uma fração de material parafínico, principalmente cêras. Antes de usá-lo para produzir proteínas microbianas, deve-se eliminar as cêras parafínicas (70), seja por extração com solventes ou por cristalização a baixa temperatura.

Os microrganismos obtidos de óleo de gás e de querosene como matérias-primas, contêm 40-50% de proteínas/microrganismo seco. Contêm todos os aminoácidos que aparecem na torta de soja, com exceção da cistina (16, 18, 70).

c) n-alcanos. São hidrocarbonetos de cadeia normal contendo frações n-parafínicas de C₁₀ até C₃₀ (70), numa proporção de aproximadamente 90%, e menos de 10% de isoparafinas, parafinas cíclicas e naftalenos, sendo que essa pequena fração não é assimilada pelos microrganismos para produção de proteínas.

2. Purificação da proteína microbiana

No final da fermentação, a concentração microbiana celular é ao redor de 1,5% na base seca (70). As células devem ser separadas do meio de fermentação já esgotado e, a seguir, concentradas e purificadas. A concentração é normalmente realizada por centrifugação. As células obtidas de metano não apresentam problemas de purificação; não são assim aquelas obtidas de querosene, óleo de gás e parafinas purificadas, sendo que estas últimas deixam um resíduo de hidrocarbonetos não assimilável pelo microrganismo e que não é fácil de se eliminar (70).

No caso de se usar hidrocarbonetos líquidos, a separação das células por centrifugação torna-se uma operação difícil, porque parte das células está na fase hidrocarboneto e parte na fase aquosa (70). Além disso, o óleo de gás contém produtos aromáticos, que devem ser eliminados para se poder ter, assim, uma proteína sadia para consumo humano e animal.

A purificação das células obtidas de óleo de gás está sendo realizada por extração com solventes, o qual aumenta enormemente o custo operacional de qualquer possível planta produtora.

3. Possibilidades econômicas

Segundo a "Esso Research and Engineering Co.", o preço da célula microbiana com 50% de proteína seria de aproximadamente US\$0,175 por libra (4, 70). A British Petroleum Co. avalia que, para produzir proteínas a partir de n-parafinas, as despesas de custo, em porcentagem, serão as seguintes: matéria-prima, 30%; aeração e agitação, 15%; recuperação, 15%; mão-de-obra e depreciação, 40% (44, 70).

4. Cultivo de bactérias em metano

O metano sob a forma de gás natural é o hidrocarboneto mais abundante e barato que se conhece. Vã-

rios tipos de microrganismos usam o metano como matéria-prima energética e fornecedora de carbono, tendo sido classificados como *Methanomonas methanica*. Foster e Davis (25) descreveram um diplococcus que pode crescer a 50°C., o *Methylococcus capsulatus*.

Vary e Johnson (69) isolaram uma mistura de bactérias oxidadoras de metano, que denominaram de cultura "HR", de rápido crescimento e que produz altos rendimentos de proteínas. Descobriram que, com metano, as condições ótimas de crescimento são conseguidas em pH 6,5, sendo o tempo de geração de 3 horas e o rendimento celular de 65-70%. Essa cultura somente utilizava metano; o propano não era usado pela mesma. O meio de crescimento e produção (meio B), empregado por esses autores, tem a seguinte composição:

Meio B (Vary and Johnson)

<u>Componentes</u>	<u>g/l</u>
K H ₂ P O ₄	3,40
(NH ₄) ₂ H P O ₄	0,66
Na ₂ H P O ₄	2,84
Mg S O ₄ . 7 H ₂ O	0,04
Ca Cl ₂	0,003
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1,2 x 10 ⁻⁴
Cu SO ₄	0,2 x 10 ⁻⁴

Tôdas as experiências de produção foram realizadas burbulhando-se, no meio B, uma mistura de 8% de metano no ar, à temperatura de 30°C. O rendimento de células secas/oxigênio consumido, foi de cerca de 0,2 grama. Segundo esses autores, a melhor temperatura de crescimento oscilou ao redor de 30°C. As células obtidas tinham a seguinte composição química; carbono, 46,7%; hidrogênio, 7,1%; e nitrogênio, 9,48%. A composição química em aminoácidos era a seguinte:

<u>Aminoácidos</u>	<u>Porcentagem da proteína crua</u>
Arginina	5,0
Ácido glutâmico	11,5
Glicina	7,7
Histidina	1,9
Isoleucina	6,1
Leucina	9,1
Lisina	5,3
Metionina	3,4
Fenilalanina	6,2
Treonina	4,5
Tirosina	4,1
Valina	8,5

5. Cultivo de leveduras em óleo de gás

O óleo de gás é formado por hidrocarbonetos de composição química complexa, sendo que cerca de 1/5 deles corresponde à série parafínica. A composição da fração parafínica não é homogênea e varia de acordo com a matéria-prima empregada na destilação, assim como a temperatura média da destilação (21).

Dostálek, Munk & outros (21), estudaram a produção de proteínas microbianas com a desparafinização simultânea do óleo de gás; além disso, estudaram a relação entre o crescimento da levedura *Candida lipolytica* durante a degradação de n-alcenos individuais e as mudanças no ponto de congelamento do óleo de gás. Estudando o crescimento da levedura em três classes de óleo de gás, esses autores encontraram que o consumo

ou degradação de pentadecano, hexadecano e heptadecano, foi proporcionalmente igual durante todo o processo de cultura. Por outro lado, durante a primeira fase de crescimento, a levedura consumia mais rapidamente moléculas de n-alcenos de cadeias curtas, p. ex., nonano e tetradecano; enquanto que cadeias mais compridas, p. ex., octadecano (C₁₈) e pentacosano (C₂₅) foram consumidas muito mais lentamente. A utilização de n-alcenos com cadeias compridas, não se dá antes que a concentração dos outros n-alcenos diminua. Somente, então, aparece o rápido decréscimo do ponto de congelamento. Esses autores isolaram a *Candida lipolytica* de um campo petrolífero, e a cultivaram num meio de cultura da seguinte composição:

K H ₂ PO ₄	7,0 gramas
(N H ₄) Cl	5,0 gramas
Mg SO ₄	0,2 grama
Na Cl	0,1 grama
Gás de óleo	80 - 200ml
Água	1.000 ml

O inóculo foi preparado utilizando-se um meio de cultura com 10% de óleo de gás. A fermentação foi realizada num fermentador de 100 litros de capacidade útil e agitado com um agitador tipo turbina a 950 r.p.m., aereado à razão de 1,5ℓ de ar por litro de meio, por minuto; a temperatura foi de 30°C e o pH controlado automaticamente em 4,5, por adição de KOH.

Klug & Markovetz (40) propuseram o seguinte meio de cultura para a fermentação de hidrocarbonetos usando *C. lipolytica*; para um fermentador de 14 litros de volume útil, adicionam-se 10 litros de meio, com a seguinte composição em sais minerais, por litro de água destilada:

K H ₂ PO ₄	7,0 gramas
Na ₂ H PO ₄	1,2 gramas
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	200 mg
(N H ₄) ₂ SO ₄	3,0 gramas
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	50 mg
Na Cl	50 mg
Cu SO ₄ . 5 H ₂ O	80 mg
K I	200 mg
FeCl ₃ 6 H ₂ O	1 mg
Mn SO ₄ . 2 H ₂ O	30 mg
Na ₂ Mo O ₄ . H ₂ O	10 mg
Zn SO ₄	80 mg
H ₃ B O ₃	500 mg

A êsse meio adiciona-se uma quantidade suficiente de n-alcanos, esterilizados por filtração, para se obter uma concentração de 1,0% no momento da inoculação. A fermentação foi realizada com uma agitação de 400 r.p.m., durante 60 h a 30°C, com uma aeração de 200-300 ml/min.

III - TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Equipamentos de fermentação

Os equipamentos de fermentação, normalmente empregados para produzir proteínas microbianas de carboidratos como matéria-prima, não podem ser usados, com êxito, com hidrocarbonetos, visto que, nestes últimos, o oxigênio requerido e a transferência de sua massa devem ser muito maiores que no primeiro caso. Exigem, portanto, equipamentos especialmente desenhados para êsse fim.

O objetivo principal deste trabalho consistiu no cálculo, estudo, projeto e desenho de um fermentador específico para ser usado na produção de proteínas de derivados do petróleo. Esse equipamento por nós desenhado, foi construído e testado por uma indústria metalúrgica norte-americana dedicada à construção de equipamentos para a indústria de fermentação. Os resultados obtidos na transferência de massa com esse equipamento foram ótimos, sendo que duas companhias adquiriram tais unidades (American Oil Co. e Pfizer) para realizar as experiências de produção de proteínas empregando metano e óleo de gás. Das duas unidades construídas, uma foi à prova de explosão para ser usada com metano o óleo de gás, e a outra foi um tipo padrão, não à prova de explosão, para ser usado com óleo de gás. Dois acessórios originais foram construídos para esse equipamento e patenteados nos Estados Unidos da América, pelo autor do presente trabalho e por Mr. David Freedman, presidente da New Brunswick Scientific Co., companhia onde foi realizado o referido trabalho e que construiu os dois fermentadores mencionados (26, 27).

O oxigênio requerido quando se usam carboidratos como matéria-prima é de 1,0 g de oxigênio/g de célula produzida; e a transferência de oxigênio requerida é de 108 g Mole de $O_2/1 \text{ x h}$. Para o metano é, respectivamente: 5,0 g de O_2/g célula produzida e 540 g Mole de $O_2/1 \text{ x h}$ (70); para o gás-oil é, respectivamente, 3,3 g de O_2/g de célula produzida e 356 g Mole de $O_2/1 \text{ x h}$. Os equipamentos padrões de fermentação raramente alcançam valores superiores a 300 g Mole de $O_2/1 \text{ x h}$, sendo este o motivo principal da construção de um equipamento que possa alcançar valores de transferência de oxigênio maiores que 300 g Mole de $O_2/1 \text{ x h}$, para se poder, assim, obter melhores rendimentos de proteínas em derivados do petróleo.

Nossa pesquisa se concentra, principalmente, no estudo dos fatores de que depende a transferência do oxigênio, de maneira a poder desenhar as partes do

equipamento de forma a se conseguir o melhor valor de oxigenação. Além disso, em desenhar um equipamento complementar estanque, para evitar as perdas do metano, principalmente pelo eixo do agitador.

O motivo porque os carboidratos requerem menos oxigênio que os derivados do petróleo é que os primeiros já estão parcialmente oxidados, o que não acontece com os segundos. O rendimento celular usando carboidratos como matéria-prima, oscila entre 0,8 - 1,0 g de célula/g de oxigênio consumido; com o metano, o rendimento é de aproximadamente 0,2 g de célula/g de oxigênio consumido. Isso indica que o consumo de oxigênio é quatro a cinco vezes maior do que com carboidratos. Significa que se os hidrocarbonetos forem fermentados nos mesmos tipos de equipamentos e condições físicas de trabalho para os carboidratos, obtém-se de 1/4 a 1/5 do rendimento destes últimos (34, 70).

Das companhias mundialmente conhecidas como fabricantes de equipamentos para a indústria de fermentação, seja em escala piloto ou industrial, a maioria ainda não se encontra em condições de construir equipamentos específicos para a fermentação de hidrocarbonetos. Quer por não terem ainda interesse comercial nesse tipo de fermentador, quer por falta de experiência em relação às condições ideais da transferência de oxigênio. Existem cinco companhias mundialmente conhecidas que competem, fortemente, nesse campo especializado, e que são:

1. MARUBISHI LABORATORY EQUIPMENT Co., Ltd., Japão. Aparentemente essa companhia não fabrica aparelhos para a fermentação de hidrocarbonetos.
2. BIOTEC A.B., Suécia. Aparentemente não fabrica aparelhos para a fermentação de hidrocarbonetos.

3. FERMENTATION DESIGN, Inc., U.S.A. Atualmente, está construindo um fermentador experimental específico para a fermentação de hidrocarbonetos.
4. NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co., U.S.A. Essa companhia já fabricou duas unidades de fermentação-piloto para hidrocarbonetos, baseadas no desenho e nas experiências realizadas pelo autor do presente trabalho.
5. CHEMAP A.G., Suíça. Essa companhia foi a primeira a fabricar fermentadores para derivados do petróleo e a colocá-los à venda no mercado mundial.

A Chemap desenhou e construiu um fermentador denominado "Múltiplo estágio", que produz valores de oxigênio dissolvido de 350-400 nMol de O₂/l/h, obtidos pelo "Método de Sulfito". O nome "múltiplo estágio" desse fermentador, refere-se ao sistema de agitação, o qual produz uma fina distribuição das borbulhas do ar com o caminhamento mais longo possível dentro no líquido. Esse tipo de agitação é apropriado para a fermentação de hidrocarbonetos que são insolúveis em água; isto é, para sistemas de "múltiplas fases". Estes hidrocarbonetos podem ser dispersados em pequenas esferas de poucos microns de diâmetro, sem necessidade de adicionar emulsificantes ou outros aditivos. O efeito emulsificante das três fases (água + hidrocarbonetos + ar) é praticamente instantâneo. Um grande número de turbinas emulsionadoras estão montadas no eixo central. Além disso, tem um tubo central com pequenos orifícios por onde o líquido é aspirado. A velocidade rotacional de agitação é de 2.500 - 3.000 r.p.m., sendo que a essa velocidade o tamanho dos glóbulos da fase descontínua é mantido entre 1 - 10 microns, dependendo dos pequenos orifícios na frente das turbinas. A passagem do líquido através desses pequenos orifícios produz a sua emulsificação. Devido à agitação forte, o líquido dentro do fermentador aumenta seu

volume em 30%, aproximadamente. A quantidade de ar que pode ser introduzida nesse sistema, alcança 5 vol./min. A figura 2 mostra um esquema desse tipo de fermentador.

2. Eficiência dos equipamentos desenhados - Transferência de massa de oxigênio.

A eficiência do sistema de aeração para determinar as variáveis necessárias para o desenho do fermentador em consideração, foi determinada pelo "método do Sulfito", amplamente usado para esse fim. Baseia-se no fato que o sulfito de sódio é quase instantaneamente oxidado por oxigênio dissolvido, sempre que é fornecido e estiver presente um catalizador consistindo de um sal de metal pesado. Essa reação se produz num tempo muito mais reduzido do que aquele necessário para o oxigênio ser absorvido pela solução em consideração, de maneira que a quantidade de sulfito oxidado é interpretado como o valor de absorção. Essa consideração é válida para uma ampla margem de concentração de sulfito em solução, de maneira que várias determinações sucessivas serão válidas até que o sulfito fique praticamente esgotado. A oxidação do sulfito e a massa de oxigênio dissolvido estão numa relação linear e podem ser interpretadas de acordo com a seguinte equação:

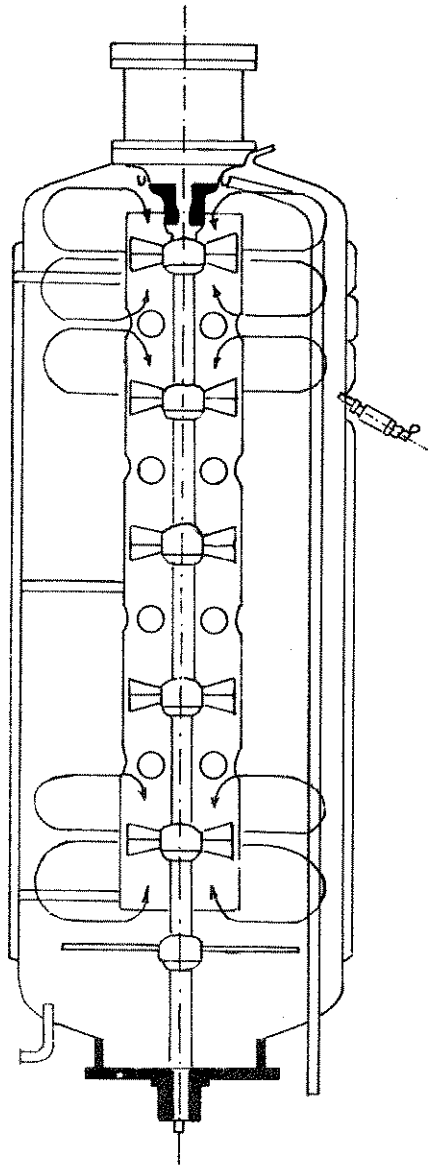
$$M = K_L \alpha (C_g - C_l) \quad (\text{equação 1}) \quad (73) \quad \text{onde:}$$

M = massa de oxigênio dissolvido, g Mole.

K_L = coeficiente total de transferência de massa, g Mole/h x cm².

α = área da interfase, cm².

C_g = concentração de oxigênio na interfase, sendo igual ao valor de saturação para ar/água à temperatura dada, g/Mole/cm³.



Esquema de um fermentador da Chemap.,
para a fermentação de hidrocarbonetos.

FIGURA 2.

C_1 = concentração de oxigênio na água. Isto pode ser considerado igual a zero em nossas condições de ensaio, porquanto a análise de oxidação é realizada posteriormente à eliminação total do oxigênio da água, pela adição do sulfito.

É quase impossível medir exatamente a área da interfase (α). Usa-se, por isso, um fator combinado $K_L \alpha$, o qual é dado nas unidades $\text{mMO}_2/\text{h} \times \text{l}$ (73). O valor do K_L só se refere à transferência da massa de uma bôlha de ar ao líquido.

Como já foi mencionado, a absorção física do oxigênio é uma função do desenho e das características operacionais do fermentador, e das propriedades físicas do meio de fermentação. Uma das fases mais importantes da bio-engenharia é o problema de suprir o oxigênio suficiente no processo fermentativo aeróbico, para obtenção de proteínas do petróleo. Os métodos de desenho e o controle da eficiência do trabalho dependerão, principalmente, dos fatores que afetam a "Transferência de Oxigênio" nesse sistema aeróbico de fermentação. O estudo por nós efetuado com diferentes tipos de agitadores, usando o método do sulfito, colabora no sentido de se conhecer a capacidade do equipamento para suprir os requisitos necessários à obtenção de proteínas microbianas de hidrocarbonetos, inclusive para qualquer outro sistema fermentativo aeróbico em estudo.

No ensaio do sulfito, a temperatura tem muita importância (17) na velocidade de reação, sendo que esta é duplicada quando a temperatura se eleva de 0 a 10°C, e aumenta mais lentamente às temperaturas de 20 a 40°C. O fato mais interessante dessa reação está na sua independência da concentração do ionsulfito numa ampla escala de concentração.

O procedimento seguido para realizar os ensaios de oxidação é o seguinte: coloca-se água no fer-

mentador à temperatura normal; liga-se o sistema automático de controle da temperatura, regulado no ponto de ensaio desejado; liga-se o agitador e adiciona-se, depois, o sulfito de sódio p.a., em cristais, na concentração de aproximadamente 0,5 Normal em ionsulfito; adiciona-se, então, o sulfato de cobre p.a., para introduzir ions cúpricos como catalizadores, à concentração de pelo menos 10^{-3} Molar. Estando tudo dissolvido, introduz-se o ar e liga-se o cronômetro no exato momento que emerge a primeira borbulha de ar do areaador. O volume de ar em ensaio deve ser ajustado em poucos segundos, usando-se um fluxômetro de precisão. Deixa-se oxidar a solução durante um período de 20 minutos, fecha-se o ar, imediatamente, e interrompem-se o agitador e o cronômetro, tudo isso sendo feito o mais simultaneamente possível. O valor de absorção de oxigênio é então calculado pela determinação analítica do ionsulfito não oxidado, contido na solução antes e depois da experiência. Amostras de 5 ml são pipetadas antes e depois do ensaio, sendo que cada amostra é colocada imediatamente dentro de um excesso de reativo padrão 0,1 Normal de iôdo, recentemente pipetado. A análise é completada pelo método iodométrico de titulação padrão de tiosulfato de sódio 0,1 Normal, usando-se o indicador amido para determinar o ponto final. Para evitar uma oxidação posterior da amostra durante a transferência, a pipeta é pulverizada com nitrogênio durante uns minutos antes de tirar a amostra.

Em nossas experiências, o "Valor de Oxidação do Sulfito" foi determinado partindo-se da equação do "Coeficiente de Absorção de Oxigênio", obtida pelo método modificado do sulfito, de Cooper, Fernstrom e Miller (17). O coeficiente K_d é calculado usando-se a seguinte equação dada por Bartholomew, Karow e Sfat (8):

$$K_d = \frac{n (R_2 - R_1)}{m V \pi \frac{(C_i - C)}{C_i} (t_2 - t_1)} \quad (\text{equação 2})$$

Na qual:

n = normalidade da solução de tiosulfato. Em nosso caso solução 0,1 N:

R₁, R₂ = ml (l) de solução de tiosulfato gasto no tempo t₁ e t₂.

V = volume da amostra, ml (l).

C_i = concentração do oxigênio de saturação na amostra: g Mol O₂/ml, mMole O₂/l.

C = concentração corrigida de oxigênio na amostra, g Mol. O₂/ml, mMol * O₂/l. Essa concentração é tão pequena que pode ser considerada igual a zero (71); principalmente, porque sais dissolvidos em água, como é o caso presente, produzem uma grande diminuição na solubilidade do oxigênio na água.

p_i = pressão parcial do oxigênio no ar entrante, atm. Pode-se considerar a pressão parcial do oxigênio no ar entrante em aproximadamente 0,21 atm., porquanto a pressão parcial desse gás seria a pressão que teria se se encontrasse ocupando por si só todo o volume de ar. Esse valor obtém-se considerando o ar uma mistura de 21% de oxigênio e 79% de nitrogênio.

$$P_2 V_2 = P_{O_2} V \quad \frac{P_2 V_2}{V} = P_{O_2} = \frac{1 \text{ atm.} \times 21}{100}$$

m = 4 x 10³ milequivalente/g Mole O₂/ml.

4 x 10⁻³ milequivalente/mMole O₂/litro.

Esse resultado é obtido dos valores de oxidação do sulfito, onde 63 g de sulfito de sódio (equivalente) reagem com 16 g de oxigênio, para formar sulfato de sódio, dando, então, 4 equivalentes sulfito/g Mol. O₂.

Partindo-se da equação 2, obtêm-se o Valor de Sulfito "K_s".

$$K_s = K_d \pi = \frac{n (R_2 - R_1)}{m V (t_2 - t_1)}, \text{ mMole O}_2/\text{l/h} \quad (\text{equação 3})$$

3. Equipamento e sistemas de agitação testados

Foram calculados, desenhados e construídos nove diferentes tipos de impulsores, a partir dos quais foram realizados testes, usando-se 12 sistemas diferentes de agitação. Os impulsores foram testados em dois fermentadores; um de 14 litros de capacidade total e construído de vidro Pyrex; outro de 28 litros de capacidade total, construído de aço inoxidável tipo 316. Esses dois tamanhos de fermentadores são os mais comumente usados pelos pesquisadores, porque situam-se numa faixa entre o laboratório e a planta-piloto. Por isso, decidimos concentrar nossos esforços nesse tipo de equipamento, e os dados obtidos poderão ser usados para a realização de experiências em equipamentos de tamanho industrial. O fermentador de 14 litros foi testado só até uma velocidade de 1.000 r.p.m., visto considerarmos essa velocidade como sendo a máxima para a segurança do pesquisador que trabalha com um fermentador de vidro. No fermentador de 28 litros, chegou-se até 2.000 r.p.m., porque era construído de aço. No fermentador de vidro, usou-se apenas sistemas impulsores agitadores do tipo convencional; por outro lado, no de 28 litros foram usados os dois tipos: o convencional e o Waldhof. O sistema de agitação tipo Waldhof trabalha bem na velocidade rotacional acima de 1.000 r.p.m. e por isso não foi empregado no fermentador de vidro. Para calcular e desenhar os impulsores convencionais, baseamo-nos em nossa experiência pessoal e na forma aproximada aos valores geométricos tipo padrão, dados quando se calcula a potência de agitação de líquidos Newtonianos; isto é, baseado no "Número de Potência, N_p" e "Número de Reynolds, N_{Re}". Para calcular e desenhar os impulsores tipo Waldhof, baseamo-nos na nossa experiência, em desenho desse tipo de agitadores.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, mostram os diferentes sistemas impulsores-agitadores por nós usados.

O quadro 2 mostra as dimensões dos sistemas impulsores-agitadores por nós usados. Todas as dimensões são dadas em polegadas, porque são as dimensões originais, sendo difícil e pouco prático convertê-las ao sistema métrico.

Os resultados obtidos nos ensaios de transferência de oxigênio para os fermentadores de 14 e 28 litros, para os diferentes sistemas impulsores-agitadores testados e sob as variadas condições de volume útil de fermentação, velocidade rotacional do agitador, volume de ar introduzido e pressão parcial de oxigênio, são dados nos quadros 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Para o fermentador de 28 litros, o volume útil de fermentação está regulado pela velocidade do agitador, sendo que a 2.000 r.p.m. o volume útil de trabalho não pode ser ultrapassado de 18 litros para os sistemas agitadores-impulsores convencionais (A,B,C, N), usando-se 44 litros de ar/min. Com o sistema "O", o máximo volume útil de trabalho oscila em 14 litros. Isso significa que são aproveitados, no primeiro caso, cerca de 65% da capacidade total do fermentador e, no segundo, apenas 50%.

No fermentador de 14 litros conseguiu-se em todos os ensaios trabalhar com um volume útil de 10 litros, sem que ocorressem problemas de excesso de volume.

O melhor sistema impulsor-agitador e as melhores condições de trabalho para o fermentador de 28 litros foram os seguintes:

Velocidade rotacional de agitação: 2.000 r.p.m.

QUADRO 2 - Especificações das dimensões dos sistemas impulsores agitadores.

Impulsor-agitador tipo	Dimensões em polegadas												
	D	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	L	W	a	b
A	11 11/32	4 1/2 0.4 D	3 0.66D ₁	19	16 1/2 10	4 1/2 D ₁	11 11/32 D	1 5/64 0.24D ₁	61/64 0.21D ₁	23/64 1/3 L	23/32 2/3 L
B	11 11/32	4 1/2 0.4 D	3 0.66D ₁	...	1/2	19	16 1/2 10	4 1/2 D ₁	11 11/32 D	1 5/64 0.24D ₁	61/64	23/64 1/3 L	23/32
C	11 11/32	3 1/2	2 1/2	19	16 1/2 10	4	3/4
D-E	8 3/4	3 0.34 D	1 1/4 0.41D ₁	18	13 1/2	3 D ₁	8 3/4 D	4 1/64 0.21D ₁	39/64 0.2D ₁
F	8 3/4	2 59/64 0.34 D	2 13/64 0.75D ₁	...	29/64	18	13 1/2	2 59/64 D ₁	8 3/4 D	47/64 0.25D ₁	19/32 0.2D ₁	3/8 1/2 L	3/8 1/2 L
J	8 3/4	2 59/64 0.34 D	2 13/64 0.75D ₁	18	13 1/2	2 59/64 D ₁	8 3/4 D	47/64	19/32	3/8	3/8
K	8 3/4	2 59/64 0.34 D	1 27/32	18	12	4	8 3/4 D	47/64	19/32	10/64 1/5 L	37/64 4/5 L
L	8 3/4	2 59/64 0.34 D	1 27/32 1.5 D ₁	18	13 1/2	2 59/64 D ₁	8 3/4 D	47/64	19/32	10/64	37/64
M	8 3/4	2 59/64 0.34 D	1 27/32 0.5 D ₁	...	29/64	18	13 1/2	2 59/64 D ₁	8 3/4 D	47/64	19/32	10/64	37/64
N	11 11/32	3 1/2	2 1/2	19	16 1/2 10	4	3/4
O	11 11/32	3 1/2	2 1/2	5	...	19	16 1/2 10	4	12	...	3/4

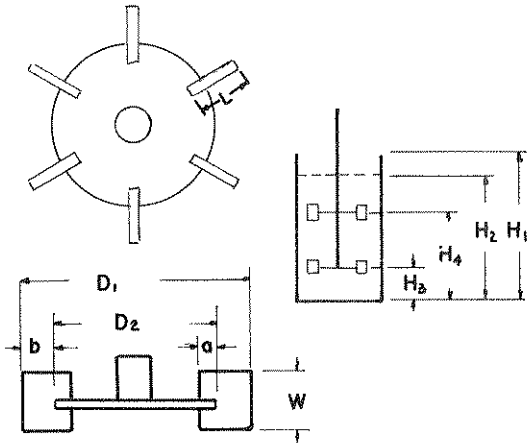


FIG.3 Impulsos
A-J-L

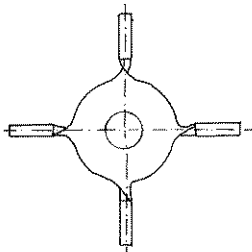


FIG.6 Impulsos
D-E

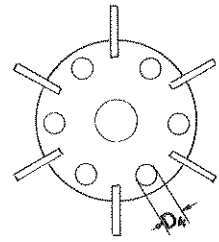
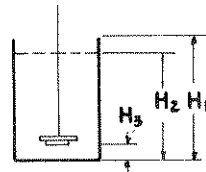
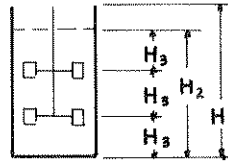


FIG.4 Impulsos
B-F-M

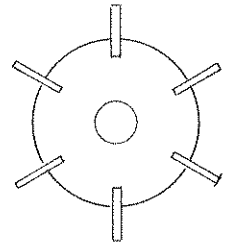


FIG.5 Impulsor K

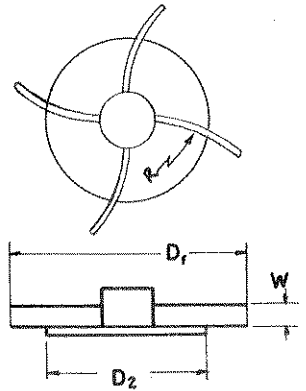


FIG.7 Impulsor C



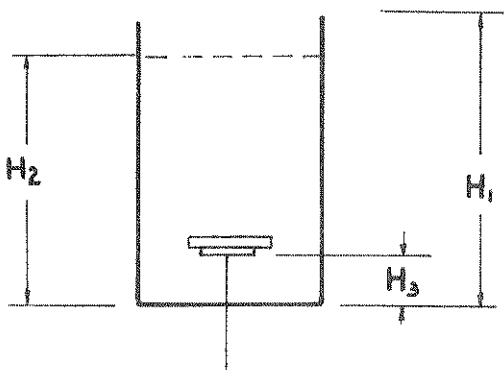
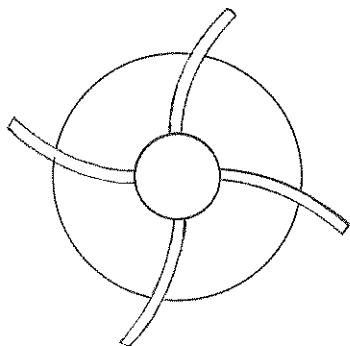


FIG.8 Impulsor N

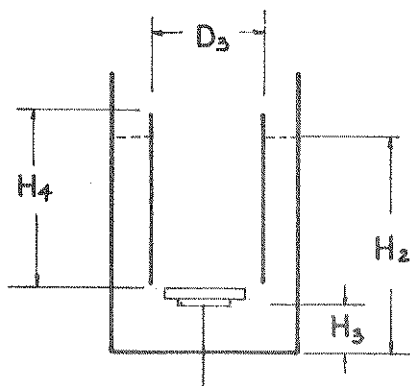
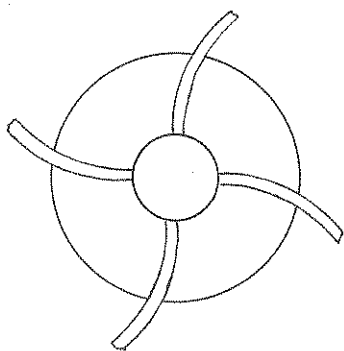


FIG.9 Impulsor O



QUADRO 3 - Transferência de oxigênio impulsor "A".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador rpm	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor da oxidação do sulfito mM O ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10-4 g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
1	22	500	44	9,8	147	2,62	30
2	22	500	22	7,5	113	2,02	23
3	18	1000	44	13,2	200	3,56	40,5
4	18	1000	22	11,2	170	3,02	34,5
5	16	1500	44	18,8	283	5,05	58
6	16	1500	22	15,7	237	4,2	48,5
7	14	2000	44	25,4	382	6,8	78
8	14	2000	22	21,2	320	5,7	64,6

Pressão diferencial do ar: 1,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,56 atm.
 Fermentador construído de aço inox. 316.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

Volume total do fermentador: 28 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspsorsor" de um orifício.

QUADRO 4 - Transferência de oxigênio impulsor "B".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador rpm.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R ₂ - R ₁) ml	Valor de oxidação do sulfito mM O ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
9	22	500	44	17,2	260	4,62	53
10	22	500	22	11,6	175	3,12	35,5
11	18	1000	44	21,8	350	5,88	67,5
12	18	1000	22	16,4	246	4,4	53,5
13	16	1500	44	27,2	415	7,32	84
14	16	1500	22	22,8	348	6,16	70,5
15	14	2000	44	32,5	490	8,78	100
16	14	2000	22	25,2	380	6,8	78

Volume total do fermentador: 28 litros.

Tipo pulverizador de ar: "aspersor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 1,7 atm. efetivas.

Pressão parcial do oxigênio (p_i O₂): 0,56 atm.

Fermentador construído de aço inox. 316.

Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 5 - Transferência de oxigênio impulsor "C".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador rpm.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada. (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM _O ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
17	22	500	44	12,3	185	3,3	38
18	22	500	22	9,4	143	2,53	29
19	18	1000	44	16,2	245	4,35	50
20	18	1000	22	12,8	182	3,42	39,5
21	16	1500	44	20,7	312	5,6	64
22	16	1500	22	16,2	245	4,38	50
23	14	2000	44	26,5	400	7,15	82
24	14	2000	22	22,8	343	6,12	70,5

Volume total do fermentador: 28 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspsor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 1,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,56 atm.
 Fermentador construído de aço inox. 316.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 6 - Transferência de oxigênio impulsor "D".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador rpm.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₈ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mMO ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 1,04 g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml - 100%
25	10	1000	16	17	256	7,05	52,5
26	10	1000	16	16,4	248	6,8	50,5
27	10	600	16	6,8	102	2,84	21
28	10	600	16	7,2	108	3,0	22
29	10	200	16	0,8	12	0,34	2,5
30	10	200	16	0,8	12	0,34	2,5
31	10	1000	4	10,2	153	0,42	31,2
32	10	1000	4	10,4	156	0,43	32

Impulsor tipo: "D" (paletas perpendiculares ao disco).

Volume total do fermentador: 14 litros.

Tipo pulverizador de ar: "aspersor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.

Pressão parcial do oxigênio (p_i O₂): 0,35 atm.

Fermentador construído de vidro Pyrex.

Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 7 - Transferência de oxigênio impulsor "E"

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador rpm.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM O ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
33	10	1000	16	11	166	4,6	34
34	10	1000	16	11,4	172	4,75	35
35	10	600	16	5,6	84	2,34	17,2
36	10	600	16	5,2	78	2,17	16
37	10	200	16	0,6	9	0,25	1,85
38	10	200	16	0,7	10,6	0,29	2,15
39	10	1000	4	8,8	134	3,68	27
40	10	1000	4	8,4	127	3,5	26

Impulsor tipo: "E" (paletas a 45° em relação ao disco)
 Volume total do fermentador: 14 litros.

Tipo pulverizador de ar: "aspsor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (p_i O₂): 0,35 atm.
 Fermentador construído de vidro Pyrex.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 8 - Transferência de oxigênio impulsor "R".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador r.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM O ₂ /h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10-4 g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml - 1 00%
41	10	1000	16	18,5	280	7,7	57
42	10	1000	16	19,2	290	8,0	59
43	10	1000	16	18,8	283	7,82	58
44	10	1000	16	19,2	290	8,0	59
45	10	600	16	6,8	103	2,85	21
46	10	200	16	1,2	18	0,5	3,7
47	10	1000	8	12,4	187	5,16	38
48	10	1000	4	7,2	108	3,0	22,2

Volume total do fermentador: 14 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspsor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,35 atm.
 Fermentador construído de vidro Pyrex.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 9 - Transferência de oxigênio impulsores "j" e "k".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador r.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM O ₂ /1/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10-4 g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml - 100%
49 (J)	10	1000	16	15,2	230	6,18	47
50 (J)	10	1000	16	14,8	223	6,2	45,8
51 (J)	10	1000	16	15,4	232	6,4	47,2
52 (K)	10	1000	16	21,2	320	8,84	65,5
53 (K)	10	1000	16	21	318	8,8	65
54 (K)	10	1000	16	21,4	322	8,88	65,8

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,35 atm.
 Fermentador construído de vidro Pyrex.
 Fermentador com 1 "baffles" padrões.

Volume total do fermentador: 14 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspersor" de um orifício.

QUADRO 10 - Transferência de oxigênio impulsor "L".

Ensaio N.º	Volume d'água do fermentador litros	Velocidade do agitador r.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R ₂ - R ₁) ml	Valor de oxidação do sulfito mmO ₂ /h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
55	10	1000	16	19,8	300	8,25	61
56	10	1000	16	21,5	323	9,00	66
57	10	1000	16	21,2	320	8,84	65,5
58	10	1000	16	20,4	307	8,45	62,2
59	10	1000	16	20,8	312	8,65	64
60	10	200	16	0,8	12	0,34	2,45
61	10	200	16	1,0	15	0,42	3,05
62	10	600	16	8,4	126	3,5	25,8
63	10	600	16	8,2	124	3,42	25,3
64	10	1000	4	10,4	156	4,35	32
65	10	1000	4	10,8	163	4,52	33,5

Volume total do fermentador: 14 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspersor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (p_i O₂): 0,35 atm.
 Fermentador construído de vidro Pyrex.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 11 - Transferência de oxigênio impulsor "M"

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador f.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfuro mmO ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10-4 g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfuro 32,5 ml. ± 1,00%
66	10	1000	16	24	360	10	74
67	10	1000	16	24,6	372	10,3	76
68	10	1000	16	24	364	10	74
69	10	1000	16	23,8	360	9,95	72,8
70	10	1000	16	24,4	368	10,2	75
71	10	1000	16	24,2	363	10,1	75
72	10	1000	12	23,2	350	9,65	71,8
73	10	1000	12	22,8	342	9,45	70,2
74	10	1000	10	19,2	290	8,0	59
75	10	1000	10	19,6	297	8,2	60,2
76	10	1000	8	18,0	270	6,4	47,2
77	10	1000	8	17,6	264	6,25	46,4
78	10	1000	4	10	150	4,15	30,8
79	10	1000	4	9,8	148	4,1	30,2
80	10	1000	0	1,0	15	0,41	3,05
81	10	1000	0	1,0	15	0,41	3,05
82	10	600	16	8,2	124	3,42	25,5
83	10	600	16	8,4	127	3,5	25,8
84	10	200	16	1,2	15,5	0,5	3,7
85	10	200	16	1,2	15,5	0,5	3,7
86	10	0	16	1,0	15	0,41	3,05
87	10	0	16	0,8	12	0,33	2,45

Pressão diferencial do ar: 0,7 atm. efetivas.
 Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,35 atm.
 Fermentador construído de vidro Pyrex.
 Fermentador com 4 "baffles" padrões.

Volume total do fermentador: 14 litros.
 Tipo pulverizador de ar: "aspsor" de um orifício.

QUADRO 12 - Transferência de oxigênio impulsor "N".

Ensaio N.º	Volume diti do fermentador litros	Velocidade do agitador r.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM O ₂ /h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g M O ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml = 100%
88	22	500	44	13,2	200	3,55	40,6
89	22	500	22	10,1	152	2,7	31
90	18	1000	44	15,8	236	4,25	48,5
91	18	1000	22	12,6	190	3,38	38,8
92	16	1500	44	19,8	300	5,3	61
93	16	1500	22	17,2	260	4,62	53
94	14	2000	44	25,6	385	6,9	79,5
95	14	2000	22	22,2	336	5,96	68,2

Volume total do fermentador: 28 litros.

Tipo pulverizador de ar: "aspersor" de um orifício.

Pressão diferencial do ar: 1,7 atm. efetivas.

Pressão parcial do oxigênio: (p_i O₂): 0,56 atm.

Fermentador construído de aço inox. 316.

Fermentador com 4 "baffles" padrões.

QUADRO 13 - Transferência de oxigênio impulsor "O".

Ensaio N.º	Volume útil do fermentador litros	Velocidade do agitador r.p.m.	Ar introduzido l/min	Quantidade de solução 0,1N Na ₂ S ₂ O ₃ usada (R2 - R1) ml	Valor de oxidação do sulfito mM ₂ /l/h	Coefficiente de absorção do oxigênio 10 ⁻⁴ g MO ₂ /ml/h/atm.	Eficiência em relação ao melhor valor do sulfito 32,5 ml * 100%
96	22	500	44	14,7	222	3,95	45,2
97	22	500	22	12,2	184	3,28	37,5
98	18	1000	44	16,2	245	4,35	50
99	18	1000	22	13,1	197	3,5	40,2
100	16	1500	44	23,8	360	6,4	73,5
101	16	1500	22	19,2	290	5,15	59
102	14	2000	44	31,5	478	8,42	97,5
103	14	2000	22	26,4	400	7,05	81,5

Pressão diferencial do ar: 1,7 atm. efetivas.

Pressão parcial do oxigênio (pi O₂): 0,56 atm.

Fermentador construído de aço inox. 316.

Fermentador com 4 "baffles" padrões.

Volume total do fermentador: 29 litros.

Tipo pulverizador de ar: "aspsor" de um orifício.

Ar introduzido: 44 litros/min.

Impulsor-agitador "B", Convencional, 490 mMO₂/1/h.

Impulsor-agitador "O", Waldhof; 478 mMO₂/1/h.

Para o fermentador de 14 litros, o melhor sistema e condições de trabalho foram os seguintes:

Velocidade rotacional de agitação: 1.000 r.p.m.

Ar introduzido: 16 litros/min.

Impulsor-Agitador "M", Convencional; 372 mMO₂/1/h.

A figura 10 mostra, grãficamente, que à medida que se aumenta a velocidade rotacional do impulsor "A", aumenta-se a transferência de massa de oxigênio, isto é, aumenta-se a eficiência do fermentador em sistemas aeróbicos. Mostra, também, que quando se aumenta o volume de ar introduzido em dôbro, produz-se uma curva praticamente paralela e proporcional à primeira.

A figura 11 mostra que com 44 litros de ar/min., usando-se o impulsor "B", a eficiência continua aumentando além de 2.000 r.p.m. Por outro lado, com 22 litros/min. a eficiência tende a ser constante acima de 2.000 r.p.m. Isso significa que, com êsse suprimento de ar, não se consegue aumentar a transferência de oxigênio, quando se aumenta a velocidade rotacional do agitador acima de 2.000 r.p.m. A curva 1 não mostra nenhum paralelismo com a curva 2, o que se deve, possivelmente, aos furos praticados no disco do impulsor.

A figura 12 mostra uma comparação da eficiência entre o impulsor "A" e "B". Indiscutivelmente, o segundo é mais eficiente que o primeiro.

A figura 13 mostra, grãficamente, os resultados obtidos com o impulsor "C". Como se pode observar, a curva 2 com 22 litros de ar/min, tende a atingir a eficiência da curva 1 com 44 litros de ar/min, quando a velocidade rotacional do agitador vai além de 2.000 r.p.m. Isto oferece uma possibilidade de alcançar valores iguais de transferência de oxigênio com velocidades superiores a 2.000 r.p.m., usando-se diferentes suprimentos de ar; em nosso caso, obter-se-ia a mesma eficiência com 22-44 litros de ar/min.

A figura 14 mostra que empregando o impulsor "N", a curva 2 tem a tendência para se separar ainda mais da curva 1, isto é, o inverso do que acontece com o impulsor "C".

A figura 15 mostra que, empregando o impulsor "O", a curva 1 tende a ser constante (por) acima de 2.000 r.p.m.

A figura 16 mostra, grãficamente, que o impulsor "O" é mais eficiente e qualquer momento que os impulsores "C" e "N", mas a baixas velocidades o impulsor "N" é mais eficiente que "C", ao passo que, às altas velocidades, acontece o inverso. O impulsor "O" tem a mesma eficiência que "C", à velocidade rotacional de 1.000 r.p.m., e o "N", a mesma eficiência que "C", à velocidade aproximada de 750 r.p.m. A eficiência do impulsor "O" aumenta bruscamente em relação aos outros dois, a partir de 1.000 r.p.m.

A figura 17 representa uma comparação dos dois melhores impulsores desenhados para o fermentador de 28 litros, isto é, "B" e "O". Até 2.000 r.p.m., o impulsor "B" é mais eficiente que "O", mas a partir de 1.000 r.p.m., "O" começa a aumentar bruscamente sua eficiência até 2.000 r.p.m., quando a eficiência de ambos os impulsores é praticamente a mesma. Isso confirma que o sistema tipo Waldhof não pode ser empregado eficientemente à velocidade rotacional inferior a 1.000 r.p.m.

A figura 18 mostra que, neste tipo de impulsor, para se obter eficiência, as paletas devem ser perpendiculares ao disco, e não com 45° de inclinação; sendo que a diferença se agrava a altas velocidades.

A figura 19 mostra que a baixas velocidades, a eficiência de ambos os impulsores é praticamente a mesma, porém a velocidades superiores a 600 r.p.m., o impulsor "M" ganha em eficiência e vai aumentando a diferença à medida que se aumenta a velocidade.

A figura 20 mostra que o impulsor "F", com o disco maior, é mais eficiente que "M", com o disco menor, a baixas velocidades. Porém, a partir de 500 r.p.m., aproximadamente, "M" é mais eficiente que "F", sendo que essa diferença se agrava à medida que a velocidade rotacional é aumentada.

A figura 21 mostra duas curvas desenhadas a partir dos dados obtidos do impulsor "M", ou seja, o melhor de todos os testados no fermentador de 14 litros. A curva 1 corresponde a uma velocidade de agitação fixa de 1.000 r.p.m., variando o suprimento de ar; a curva 2 corresponde a um suprimento fixo de ar, de 16 litros/min e velocidade variável. Ambas as curvas se unem nas seguintes condições: 1.000 r.p.m. e 16 litros/ar/min. O interessante desse gráfico é mostrar que com 16 litros ar/min constante, a eficiência não aumenta além de 1.000 r.p.m., isto é, tende a ser constante; por outro lado, mantendo-se fixa a velocidade rotacional de 1.000 r.p.m., a eficiência aumenta enormemente quando o suprimento de ar é aumentado além de 16 litros/min. Neste tipo de fermentador, não seria prático aumentar a velocidade de agitação além de 1.000 r.p.m., mas seria benéfico aumentar o suprimento de ar.

A figura 22 mostra, em detalhe, o sistema de sêlo duplo empregado para o sistema tipo Waldhof dos impulsores "N" e "O". Empregou-se um sêlo duplo para ter um fechamento perfeitamente estanque e para evitar a perda de metano ou hidrocarbonetos líquidos usados no teste fermentativo. Nesse desenho de sêlo, introduz-se água estéril para se ter sempre uma pressão

positiva dentro do sistema e impedir a entrada do meio de cultura nos rolamentos, assim como para lubrificar os rolamentos.

A figura 23 mostra o desenho do fermentador tipo Waldhof, por nós utilizado (sistema impulsor-agitador "O").

A figura 24 mostra o sistema completo de fabricação de proteínas de hidrocarbonetos, partindo de metano ou óleo de gás, empregando o sistema impulsor-agitador tipo Waldhof "O".

A eficiência fermentativa dos melhores sistemas impulsores-agitadores, foram testados com um meio de cultura contendo óleo de gás no fermentador de 14 litros, com o impulsor "M", e empregando óleo de gás ou metano, com os impulsores "B" e "O" no fermentador de 28 litros. Para a fermentação de óleo de gás, usa-se *Candida lipolytica*, e para o metano o *Pseudomona methanica*. Para este último emprega-se o meio de cultura de Vary e Johnson (Meio B) (69), enquanto que para o óleo de gás aquele de Dostálek, Munk & outros (21). O quadro 14 mostra os resultados obtidos nos testes fermentativos realizados para se obter proteínas de hidrocarbonetos com os equipamentos por nós desenhados, sendo que eles representam a média de duas experiências para cada tipo de impulsor-agitador. As células microbianas obtidas foram analisadas pelo método de Kjeldahl, dando uma porcentagem em nitrogênio que variou entre 9,2 e 9,5% sobre o peso da célula seca.

QUADRO 14 - Rendimento celular nos testes de fermentação de hidrocarbonetos

Impulsor-agitador tipo	Matéria-prima empregada	Velocidade do agitador r. p. m.	Ar introduzido l/min	Rendimento médio em g células secas/100g mat.-prima
M	Óleo de gás	1000	16	87,2
B	Óleo de gás	2000	44	94,5
O	Óleo de gás	2000	44	96
B	Metano	2000	44	59,3
O	Metano	2000	44	61,5

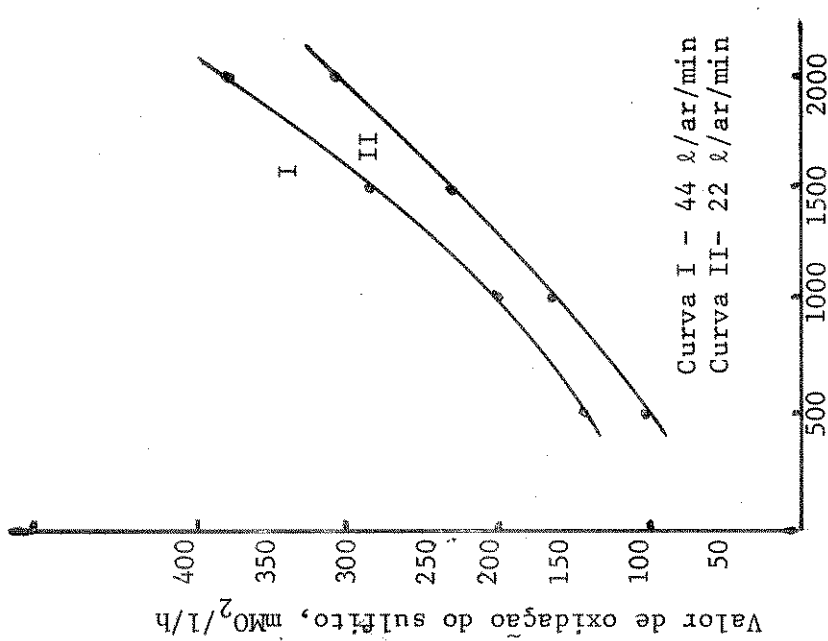


Fig. 10. Representação gráfica dos resultados do impulsor "A"

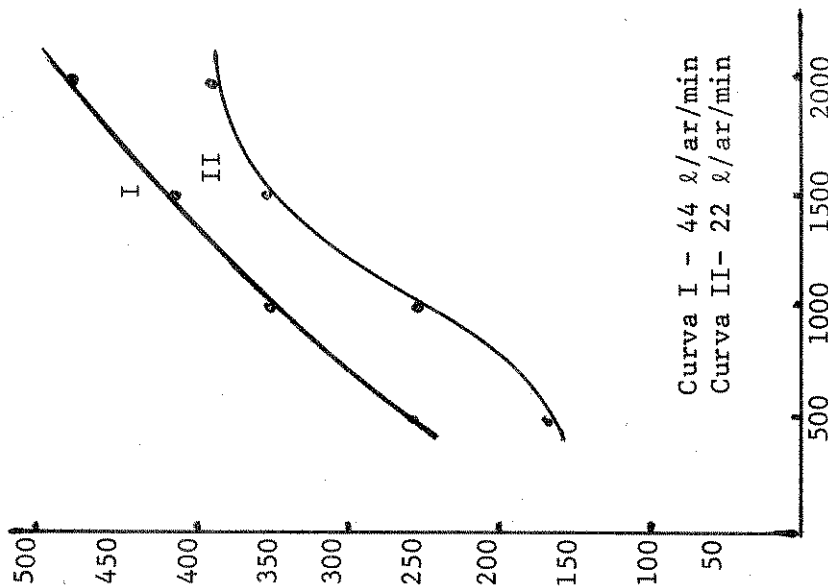


Fig. 11. Representação gráfica dos resultados do impulsor "B"

Valor de oxidação do sulfito, $\text{mMO}_2/\text{l/h}$

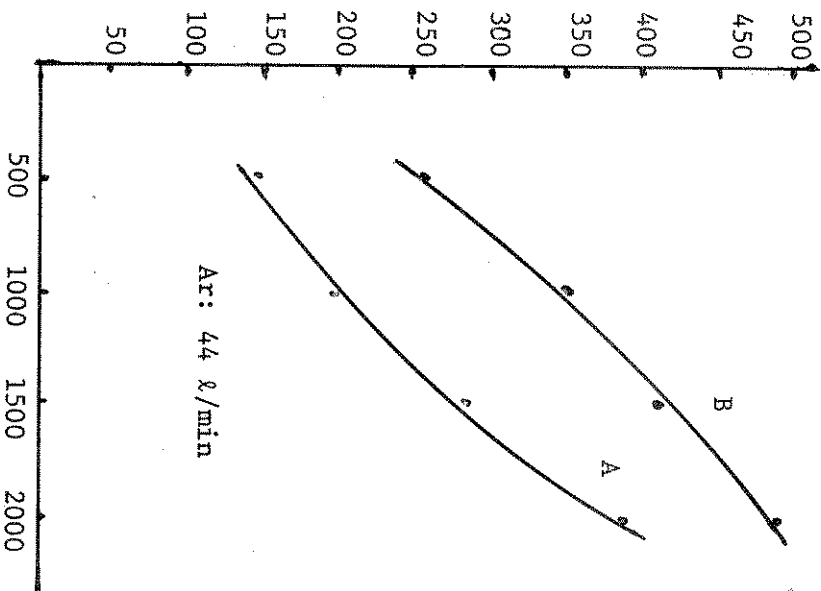


Fig. 12. Velocidade do agitador r.p.m.
Impulsor "A" (I) Vs
Impulsor "B" (I)

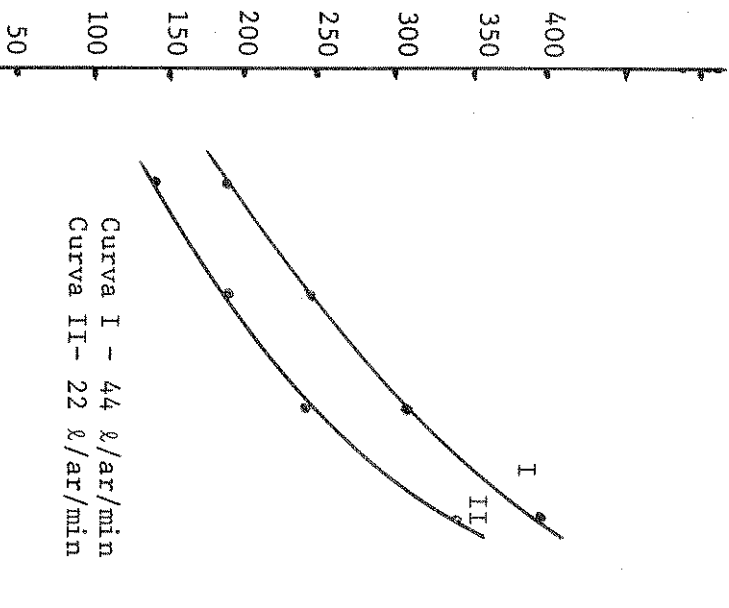


Fig. 13. Velocidade do agitador r.p.m.
resultados do impulsor "C"

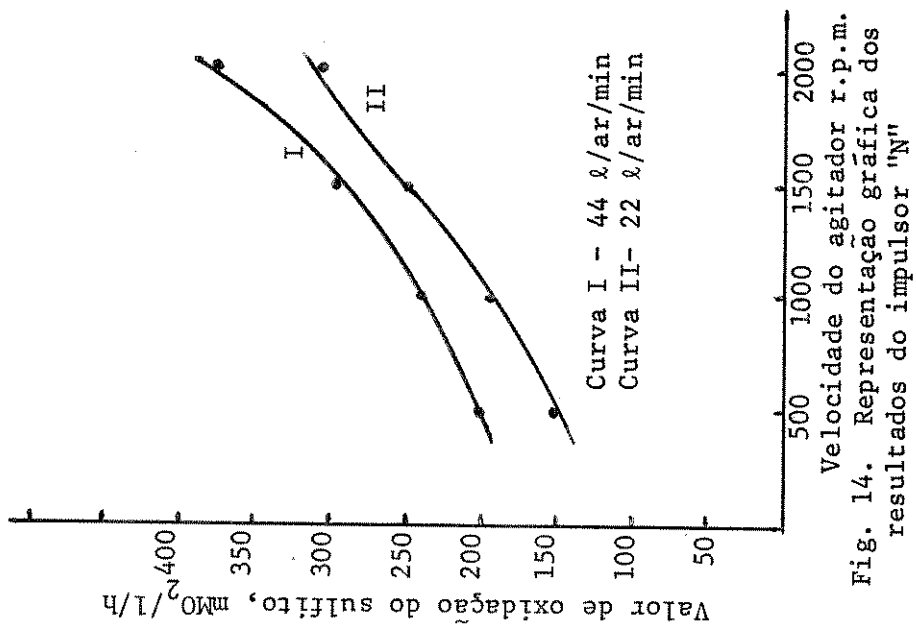


Fig. 14. Representação gráfica dos resultados do impulsor "N"

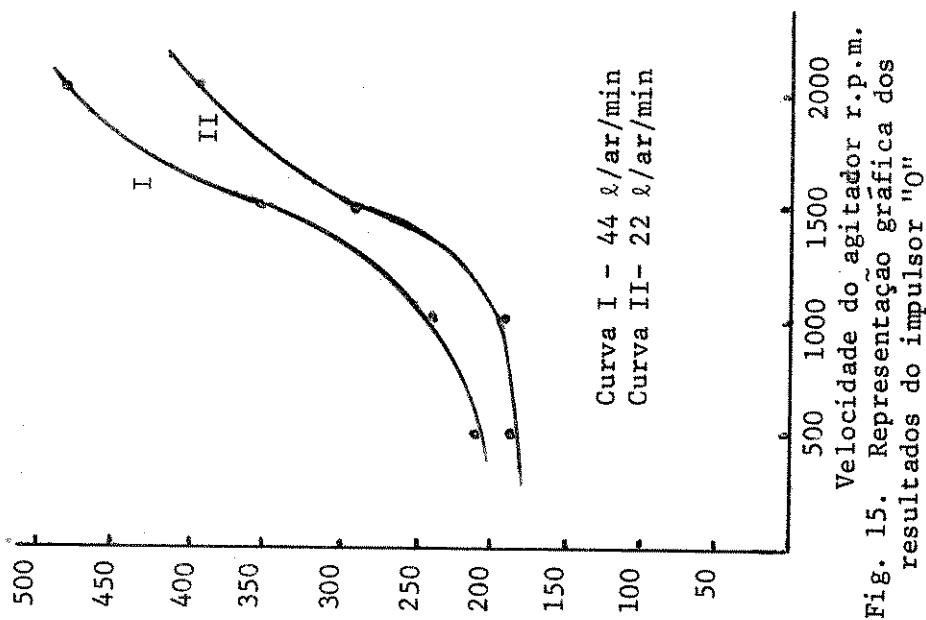


Fig. 15. Representação gráfica dos resultados do impulsor "O"

Valor de oxidação do sulfito, $\text{mMO}_2/\text{l/h}$

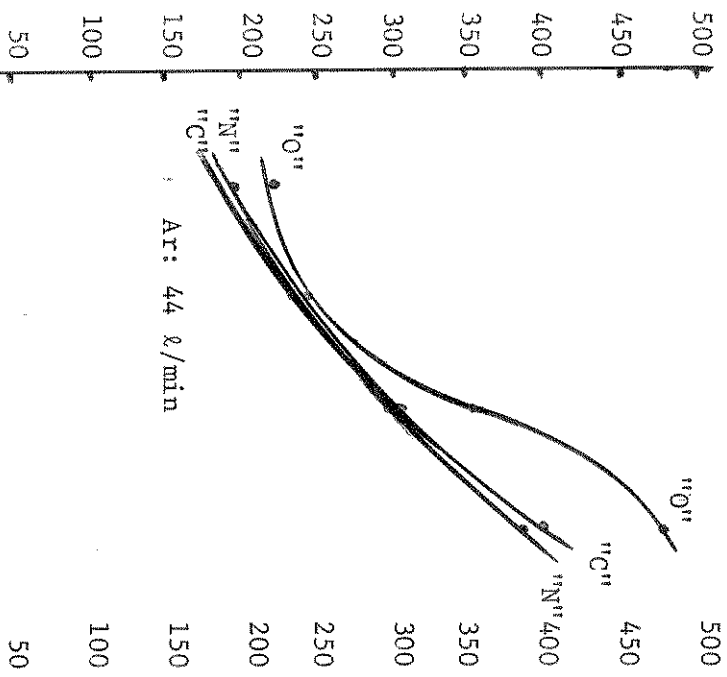


Fig. 16. Velocidade do agitador r.p.m. Vs Impulsores ${}^{11}\text{C}^{11}$ (I) Vs ${}^{11}\text{N}^{11}$ (I) Vs ${}^{11}\text{O}^{11}$ (I)

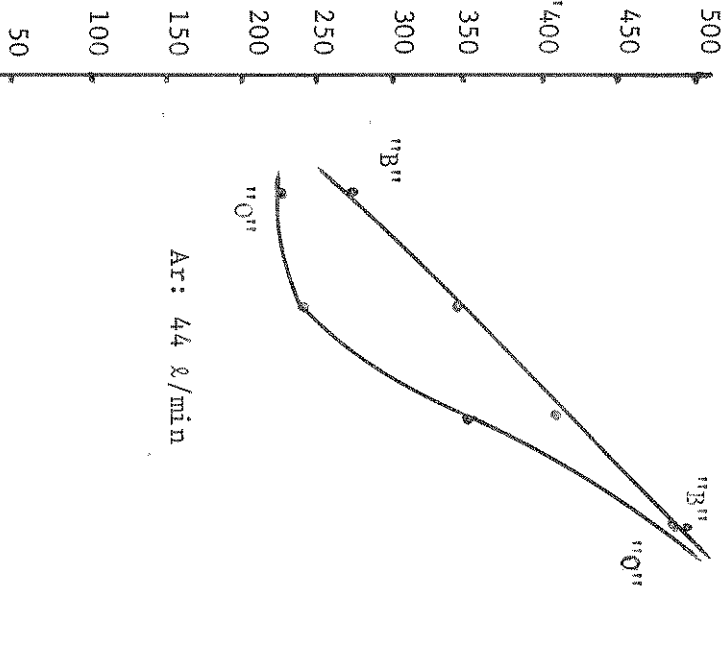


Fig. 17. Velocidade do agitador r.p.m. Vs Impulsores ${}^{11}\text{C}^{11}$ (I) Vs ${}^{11}\text{O}^{11}$ (I)

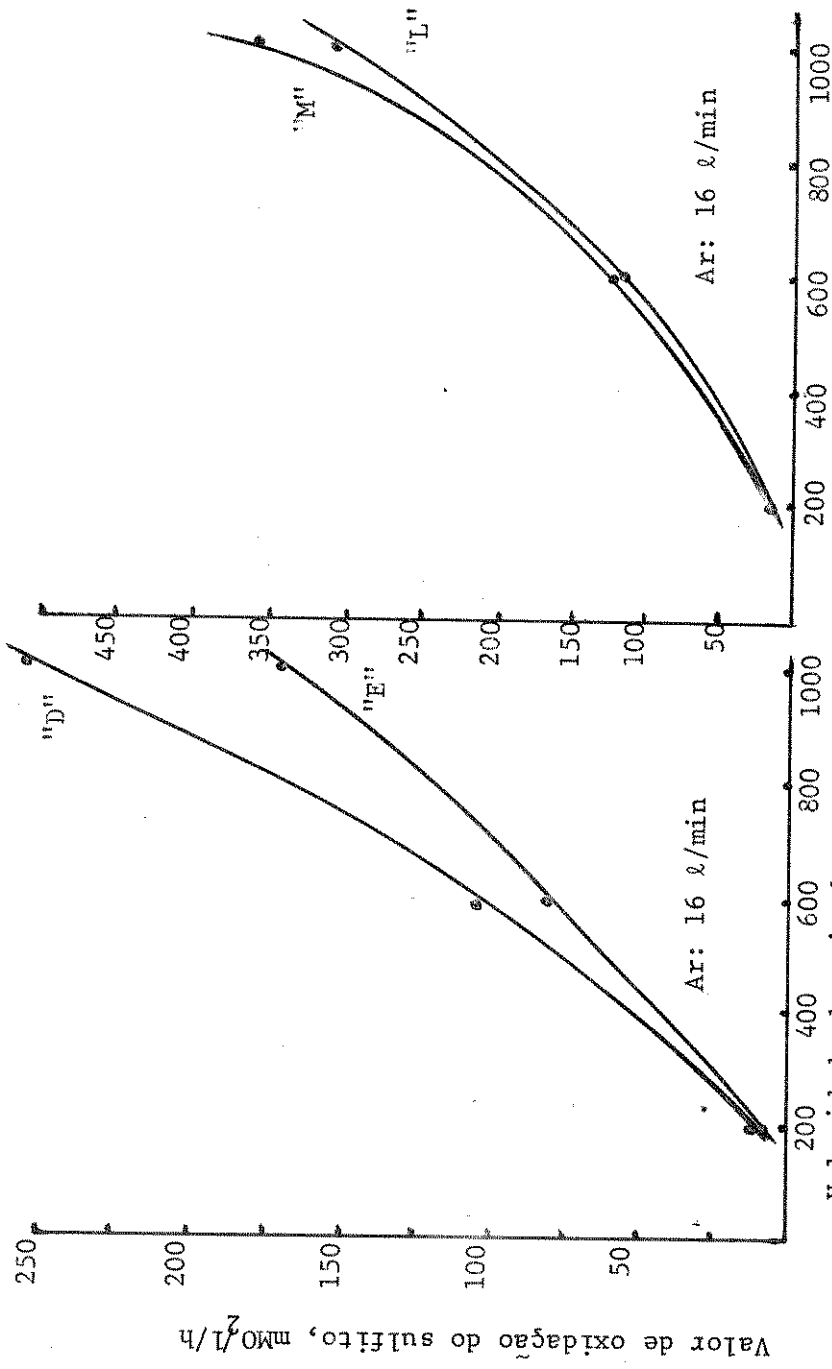


Fig. 18. Impulsores "D" Vs "E"

Fig. 19. Impulsores "L" Vs "M"

Valor de oxidação do sulfito, $\text{mMO}_2/1/\text{h}$

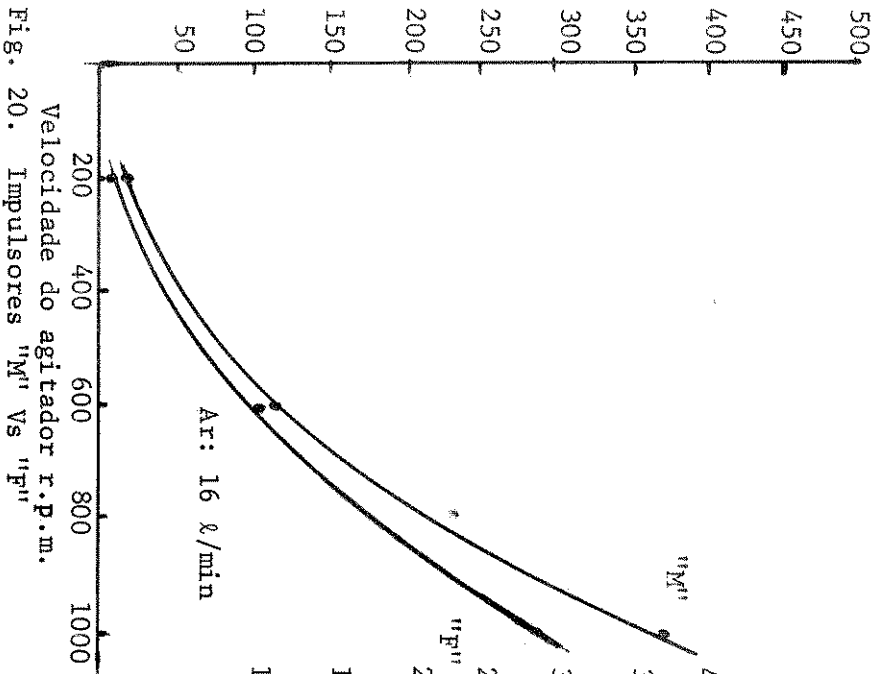


Fig. 20. Impulsores "M" Vs "F"

Velocidade do agitador r.p.m.

Ar: 16 l/min

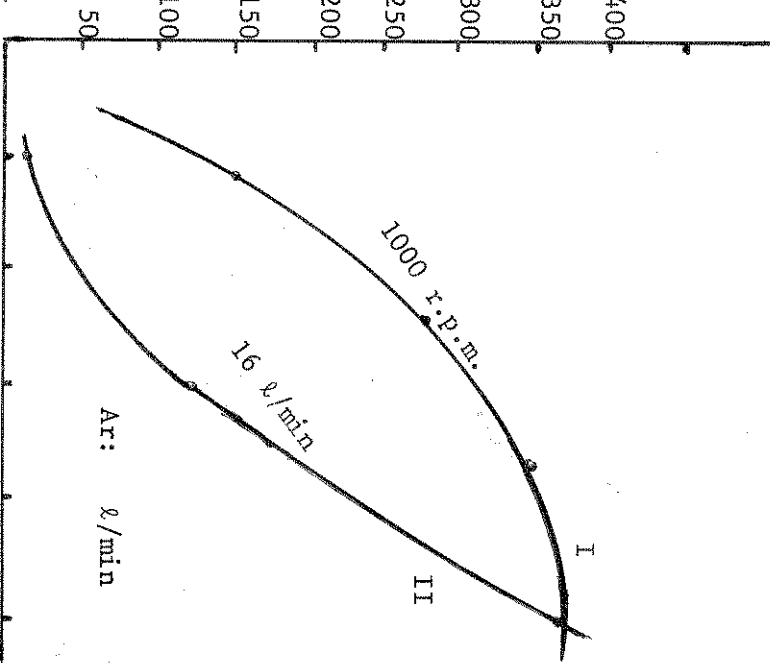


Fig. 21. Representação gráfica dos resultados do impulsor "M"

Velocidade do agitador r.p.m.

Ar: 8 l/min

V - CONCLUSÕES

Foram determinados, experimentalmente, os melhores sistemas de impulsores-agitadores, para se conseguir valores de transferência de oxigênio os mais altos possíveis, com a finalidade de se obter bons rendimentos em proteínas empregando-se hidrocarbonetos como matéria-prima. De todos os sistemas de agitação testados, verificou-se que o melhor tipo para o fermentador de 14 litros era o tipo "M", trabalhando a 1.000 r.p.m. e 16 litros de ar/min, obtendo-se um valor Sulfito de 372 $\text{mMO}_2/\text{l/h}$. Para o fermentador de 28 litros achou-se que os melhores tipos eram "B" e "O", sendo que o primeiro produz um Ks de 490 $\text{mMO}_2/\text{l/h}$, e o segundo 478 $\text{mMO}_2/\text{l/h}$, em ambos os casos trabalhando a 2.000 r.p.m. e 44 litros de ar/min.

Um fato interessante constatado é que, usando-se o impulsor "B", a eficiência aumenta quando a velocidade de agitação é aumentada além de 2.000 r.p.m., ao passo que não aumenta quando se mantém constante a velocidade rotacional em 2.000 r.p.m. e o suprimento de ar é aumentado além de 22 ℓ/min . Com o impulsor "M" acontece o contrário, isto é, mantendo-se constante o suprimento de ar em 16 ℓ/min , a eficiência de transferência de oxigênio não aumenta quando se aumenta a velocidade rotacional além de 1.000 r.p.m.; por outro lado, mantendo constante a velocidade a 1.000 r.p.m., a eficiência aumenta quando se aumenta o suprimento de ar além dos 16 ℓ/min .

Outro fator importante verificado, é que o sistema "O" não deve ser usado a velocidades inferiores a 1.000 r.p.m., para se obter boa transferência de oxigênio. Nestas condições, é muito mais vantajoso usar o sistema "B".

Nas melhores condições de transferência de oxigênio, os ensaios de fermentação empregando o metano e óleo de gás deram os rendimentos médios de 59-62 g de células secas/100 g de metano e 87-96 g de células secas/100 g de óleo de gás.

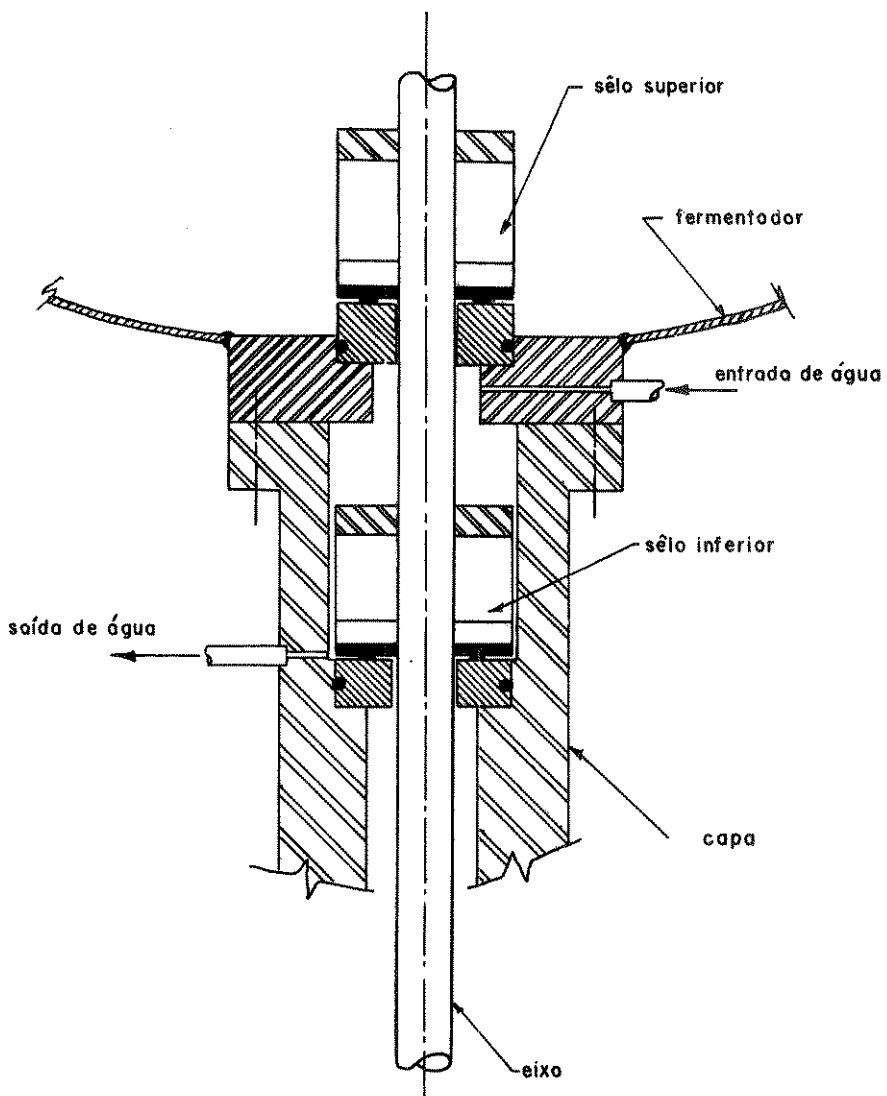


Figura 22. Conjunto do Sêto Duplo.

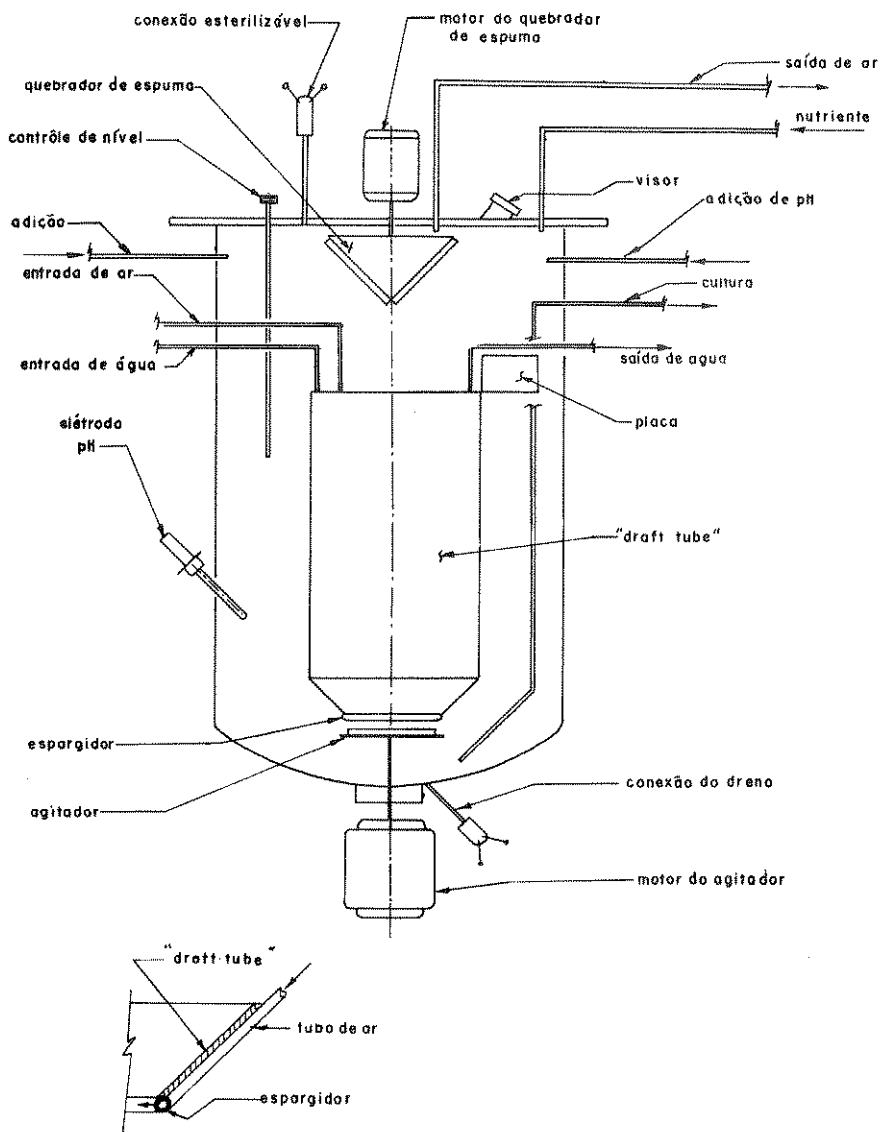


FIGURA 23. Conjunto Geral do Vaso Fermentador.

VI - RESUMO E "SUMMARY"

A produção de proteínas microbianas de hidrocarbonetos de petróleo requer solução sobre a emulsificação dos hidrocarbonetos em meio líquido, consumindo grandes quantidades de oxigênio.

Tanto a emulsificação como a transferência do oxigênio, são dificuldades apenas parcialmente solucionadas pelos aparelhos comerciais existentes no mercado.

Neste trabalho, o autor estudou os aspectos mecânicos envolvidos na velocidade de transferência do oxigênio, tendo sido alcançado um "valor sulfito" de 372 a 490 $\text{mMO}_2/1/\text{h}$, que se compara favoravelmente com aquele atingido em equipamento comercial padrão.

STUDY OF A FERMENTER FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN FROM HYDROCARBON. By R. Sadir. The production of microbial proteins from petroleum hydrocarbons requires solution on emulsification of the hydrocarbons in the liquid media, consuming large quantities of O_2 .

Both the emulsification and oxygen transfer are difficulties only imperfectly solved by commercial apparatus in the market.

In this paper the author has studied the mechanical aspects involved in the velocity transfer of oxygen and a "Sulphite Value" of 372 to 490 $\text{mMO}_2/1/\text{h}$ has been attained, which compares favorably with attained in standard commercial equipment.

LITERATURA

1. AIBA, S., HUMPHREY, A. E. & MILLIS, N.F. Bio-chemical Engineering. Academic Press, Inc., New York, 333 p., 1965.
2. ALLEN, J.E. & MARKOVETZ, A.J. Utilization of alkanes and alkenes by fungi. *In* American Society for Microbiology, 68 th. Annual Meeting, Detroit, Mich., A 31, p. 6, 1968.
3. ANÓNIMO. Bacteria metabolize methane. Chem. Eng. News. 44, June, 1966.
4. _____. Proteins grow on high - purity alkanes. Chem. Eng. News 45 (2): 46-48. 1967.
5. A.P.V. COMPANY Ltd. Crawley, Sussex, England. Continuous fermentation with the APV tower fermenter, 4 p., 1968 (Publ. A. 3806).
6. ARIMA, K., OGINO, S., YANO, K1 & TAMURA, G. Studies on utilization of hydrocarbons by yeast. Agric. Biol. Chem. 29: 1004, 1965.
7. AZOULAY, E. COUCHOUD-BEAUMONT, P. & SENEZ, J. C. Growth of *Candida lipolytica* on sugar and paraffin hydrocarbons. Ann. Inst. Pasteur 107: 520. 1964.
8. BARTHOLOMEW, W. H., KAROW, E. O. & SEAT, M. R. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. Ind. Eng. Chem. 42 (9): 1801-1809, 1950.
9. BEAVON, D.K., CHUTE, A.E. & LUPFER, G.L. Chemical production and fuels refineries. Chem. Eng. Progress, 23-28, 1969.
10. BEERSTECHEER, E. Petroleum microbiology. Elsevier Press Inc., New York, 375 p., 1954.

11. BIOTEC A.B., Stockholm, Sweden, Catalog, 1968.
12. BLAKEBROUGH, N. & SAMBAMURTHY, K. Performance of turbine impellers in sparger-aerated fermentation vessels. *Jour. Appl. Chem.*, 14: 431-422, 1964.
13. BUNKER, H.J. Microbial Food. *In Biochemistry of industrial microorganisms*. Rainbow, C. & Rose, A.H. Academic Press, London and New York, p. 34-67, 1963.
14. CHAMPAGNAT, A. & outros. Biosynthesis of protein vitamin concentrates from petroleum. *Nature*, 197: 13, 1963.
15. CHEMAP A.G., Mannedorf, Zürich, Schweiz. Catalog 1969.
16. CHEPIGO, V.S. & outros. The production and utilization of fodder yeasts grown on petroleum hydrocarbon. Presented at the 7th. World Petroleum Congress, México City, México, 1967.
- X 17. COOPER, C.M., FERNSTROM, G. A. & MILLER, S.A. Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.*, 36 (6): 504-509, 1944.
18. CRAVENS, W. W. & SIPOS, E. Soybean oil meal. *In Processed Plant Protein Foodstuffs*, A. M. Altschul, Academic Press, Inc., p. 353-397, 1958.
19. DAVIS, J. B. & outros. Atmospheric nitrogen fixation by methane - oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.*, 88 (2): 468, 1964.
20. _____. Microbial decomposition of hydrocarbons. *Indust. and Engin. Chem.* 48: 1444, 1956.

21. DOSTÁLEK, M., MUNK, V. & outros. Cultivation of the yeast *Candida lipolytica* on hydrocarbons.- I. Degradation of n-alkanes in batch fermentation of gas oil. *Biotech. and Bioeng.*, 10: 33-43, 1968.
22. DWORKIN, M. & FOSTER, J. W. Studies on *Pseudomonas methanica*. *J. Bacteriol.*, 72 (4): 646, 1956.
23. EDMONDS, P., COONEY, J. J. & KULA, T.J. Survival and growth of fuel isolates in a hydrocarbon - water system. *In American Society for Microbiology*, 68th.
24. FERMENTATION DESIGN INC., New Jersey, U.S.A., Catalog 1969.
25. FOSTER, J.W. & DAVIS, R.H. A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate, methane-utilizing bacteria. *J. Bacteriol.* 91: 1924-1931, 1966.
26. FREEDMAN, D. & SADIR, R. Centrifugal mechanical defoamer. U. S. A. Patent Docket n° 80679, HIK/hh, 1969.
27. _____ & _____. Mass transfer condenser for use with fermenting vessels. U.S.A. Patent Docket n° P 80681, HIK/hh, 1969.
28. FUHS, G.W. The microbial degradation of hydrocarbons. *Arch. Mikrobiol.* 39: 374-422, 1961.
29. GADON, E.L. Symposium on microbes and hydrocarbons. *Biotech. and Bioeng.* 9: 1-105, 1967.
30. HAMER, G. & BLAKEBROUGH, N. Turbine impellers as gas-liquid contacting devices. *J. Appl. Chem.* 13: 517-524, 1963.

31. HAMER, G. & HEDEN, C.G. Methane as a carbon source for the production of microbial cells. *Bio-tech. and Bioeng.* 9: (4), 499, 1967.
32. HART, L.T., KLUG, M. J. & MARKOVETZ, A.J. Alkane oxidation by a thermophilic bacterium. *In American Society for Microbiology, 68th. Annual Meeting, Detroit, Mich., A 47, p. 6, 1968.*
33. HIXSON, A. W. & GADEN Jr., E. L. Oxygen transfer in submerged fermentation. *Ind. and Eng. Chem.* 42 (9): 1792-1801, 1950.
34. HUMPHREY, A. E. A critical review of hydrocarbon fermentations and their industrial utilization. *Biochemical Engineering Laboratory, University of Pennsylvania (mimeografado, s.d.).*
35. HUYBREGTSE, R. & VAN DER LINDEN, A. C. The oxidation of α -olefins by a *Pseudomonas*. I. Reaction involving the double bond. *Jour. Microbiol. Serol.* 30: 185-196.
36. IIZUKA, I., IIDA, M. & UNAMI, Y. Microbiological studies on petroleum and natural gas. IX. Candidal oxidation of decane. *Jour. Gne. Appl. Microbiol.* 12: 119-126, 1966.
37. ISHIKURA, T. & FOSTER, J.W. Incorporation of molecular oxygen during microbial utilization of olefins. *Nature* 192: 892-893, 1961.
38. JOHNSON, M. J. Growth of microbial cells on hydrocarbons. *Science* 155: 1515, 1967.
39. _____. Utilization of hydrocarbons by microorganisms. *Chem. Ind. (London)*: 1532-1537, 1964.

40. KLUG, M. J. & MARKOVETZ, A. J. Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of n-Alkanes and 1. alkenes by *Candida lipolytica*. Jour. Bacteriology 93 (6):
41. LEADBETTER, E. R. & FOSTER, J. W. Bacterial oxidation of gaseous alkanes. Arch. Mikrobiol. 35: 92-194, 1960.
42. _____ & _____. Incorporation of molecular oxygen in bacterial cells utilizing hydrocarbons for growth. Nature 184: 1428-1429, 1959.
43. LEATHEN, W.W. & KINSEL, N. A. The identification of microorganisms that utilize jet fuel. Development in industrial microbiology. American Institute of Biological Sciences, 4: 9-16, 1963.
44. LLEWELYN, D.A.B. The production of protein concentrate biomass from hydrocarbons. Presented at the symposium on Microbiology, London, England, Sept. 19-20, 1967.
45. LUKINS, H.B. & FOSTER, J.W. Methyl ketone metabolism in hydrocarbon-utilizing mycobacteria. J. Bacteriol. 85: 1074-1087, 1963.
46. MARUBISHI LABORATORY EQUIPMENT Co., Ltd., Tokyo, Japan. Fermentor Marubischi, Catalog 1968.
47. MATELES, R.L. & outros. Growth of a thermophilic bacterium on hydrocarbons; a new source of single-cell protein. Science 155: 1322, 1967.
48. MC KENNA, E. J. & RALLIO, R. E. The biology of hydrocarbons. Ann. Rev. Microbiol. 19: 183-208, 1965.
49. MILLER, T.L. & JOHNSON, M.J. Utilization of normal alkanes by yeasts. Biotech. and Bioeng. 8 (4): 549, 1966.

50. MILLER, T.L. & JOHNSON, M.J. Utilization of gas oil by a yeast culture. *Biotech. and Bioeng.* 8 (4): 567, 1966.
51. OTSUKA, S., TYOSUKE, I. & KATSUYA, N. Utilization of hydrocarbons as carbon sources in production of yeast cells. *Jour. Gen. Appl. Microbiology* 12 (1), 1966.
52. PFAENDER, F.K. & SWATEX, E.F. Effect of flight on microorganisms on the surface of jet aircraft. *In American Society for Microbiology 68th, Annual Meeting, Detroit, Mich., A 80*, p. 14, 1968.
53. PHILLIPS, D.H. & JOHNSON, M. J. Oxygen transfer in agitated vessels. *Ind. and Eng. Chem.* 51 (1): 83-88, 1959.
54. PIERCE, D.E. *Chemical Engineering for Production Supervision.* McGraw-Hill Book Company, Inc., 1942.
55. PRINCE, A.E. Microbiological sludge in jet aircraft fuel. *Develop. Ind. Microbiol.* 2: 197-203, 1960.
56. RATLEDGE, C. Production of fatty acids and lipid by a *Candida* sp. growing on a fraction of n-alkanes predominating in tridecane. *Biotech. and Bioeng.* 10: 511-533, 1968.
57. RAYMOND, R.L. & DAVIS, J. B. n-Alkane utilization and lipid formation by a *Nocardia*. *Appl. Microbiology* 8: 329, 1960.
58. _____. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Indust. Microbiology* 2: 23, 1961.
59. ROGOFFM, H. Oxidation of aromatic compounds by bacteria. *In Advan. Appl. Microbiol.*, vol. 3, Academic Press, New York, N.Y., p.193-221, 1961.

60. SHARPLEY, J.M. Elementary petroleum microbiology. Gulf Publishing Co., Houston, Texas 375 p., 1966.
61. STOKES, J. L. Microbiol proteins. *In* Processed Plant Protein Foodstuffs. A. M. Altschul, Ed., Academic Press, Inc., p. 789-804, 1958.
62. STONE, W. R. Current problems in the oxidation of hydrocarbons by microorganisms. Developments in Industrial Microbiology. American Institute of Biological Sciences, 4: 5-8, 1963.
63. TAKEDA, I. & outros. Production of microbial cells from hydrocarbons. *Agr. Biol. Chem.* 29 (9): 799, 1965.
64. TANAKA, A. & FUKUI, S. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. III. Substrate specificity of yeast in hydrocarbon fermentation. *Jour. Ferment. Techn.* 46:214-224, 1968.
65. _____, NAGASAKI, T. & FUKUI, S. Studies on the formation of vitamins and their functions in hydrocarbon fermentation. Part II. Isolation and characterization of several carotenoids produced by *Mycobacterium smegmatis* IFO 3080. *Jour. Ferm. Techn.* 46: 477-487, 1968.
66. _____, _____ & outros. Studies on the formation of vitamins and their functions in hydrocarbon fermentation. Part I. Studies on the cultural conditions. *Jour Ferm. Techn.* 46: 468-476, 1968.
67. _____, SHIMIZU, S. & FUKUI, S. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. IV. Growth of molds on hydrocarbons. *Jour. Ferm. Techn.* 46: 461-467, 1968.

68. VAN DER LINDEN, A. C. & THYSSE, G. J. E. The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons. *Advan. Enzymol.* 27: 467-546, 1965.
69. VARY, P.S. & JOHNSON, M. J. Cell yields of bacteria grown on methane. *Appl. Microbiol.* 15 (6): 1473-1478, 1967.
70. WANG, D.I.C. Proteins from petroleum. *Chem. eng.* 75: 99-107, 1968.
71. WEBB, F. C. *Biochemical Engineering*. D. Van Nostrand Company Ltd., London, 743 p., 1964.
72. WOLNAK, B., ANDREEN, B. H. & outros. Fermentation of methane. *Biotech. and Bioeng.* 9:57, 1967.

VII - AGRADECIMENTOS

Somos profundamente gratos pela orientação do Prof. Arthur E. Humphrey, Diretor da Escola de Engenharia Química da Universidade de Pennsylvania (School of Chemistry Engineering, University of Pennsylvania), U.S.A.; ao Prof. André Tosello, digno Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, minha gratidão pelo estímulo e apoio constantes.

Nossa gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.