

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

Estudo da produção de cefalosporina C: composição do meio, produtividades específicas e caracterização reológica em processos conduzidos em batelada e batelada alimentada.

AUTORA: Leda Maria de Souza Gomes

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Fevereiro / 1998

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Unicamp
	G585e
	EX
TOMBO DCI	33736
PROD.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/05/98
N.º CPD	

CM-00111154-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

G585e Gomes, Leda Maria de Souza
Estudo da produção de cefalosporina C: composição do meio, produtividades específicas e caracterização reológica em processos conduzidos em batelada e batelada alimentada / Leda Maria de Souza Gomes.--Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientadora: Maria Helena Andrade Santana.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Reologia. 3. Fluidos não newtonianos. 4. Fungos - Cultura e meios de cultura. 5. Fungos - Biotecnologia. 6. Fungos - Morfologia. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Doutorado defendida e aprovada no dia 26 de fevereiro de 1998 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora



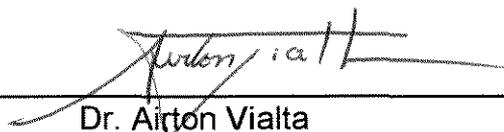
Prof.^a. Dr.^a. Iracema de Oliveira Moraes



Prof.^a. Dr.^a. Gisella Maria Zanin



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo



Dr. Ailton Vialta

Esta versão corresponde a redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida pela Eng.^a Leda Maria de Souza Gomes e aprovada pela Comissão julgadora em 26 de fevereiro de 1998.



Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

“Ouvirás muitos dizerem: ‘aos cinqüenta anos me refugiarei no ócio, aos sessenta estarei livre dos meus encargos’. E que fiador tens de uma vida tão longa? E quem garantirá que tudo irá conforme planejas? Não te envergonhas de reservar para ti apenas as sobras da vida e destinar à meditação somente a idade que já não serve para nada? Quanto tarde comesças a viver, quando já é hora de deixar de fazê-lo.

Que negligência tão louca a dos mortais, de adiar para o quinquagésimo ou sexagésimo ano os prudentes juízos e a partir deste ponto, ao qual poucos chegaram, querer começar a viver”

(Lúcio A. Sêneca - Sobre a Brevidade da Vida. Ano I - a.C.)

Aos meus pais, Eddinis e Celita (in memoriam)

Aos meus irmãos, José Maria, Maria José e Cândida Maria (in memoriam)

Aos meus filhos, Lígia e Frederico,

Ao meu companheiro, Felipe.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Maria Helena A. Santana e Prof. Dr. Carlos O. Hokka, pessoas especiais que, além de orientadores, foram muito amigos durante esta caminhada.

À Fundação Tropical de Pesquisa Tecnológica “André Tosello”, pelo fornecimento das linhagens de bactérias e fungos.

À CODETEC (Campinas,SP), pelo fornecimento de linhagens do fungo *Cephalosporium acremonium* C-10 por intermédio do Dr. Airton Vialta.

Aos colegas docentes e amigos do DEQ que sempre estiveram ao meu lado manifestando apoio e estímulo para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do DEQ que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos técnicos, Amadeus e Lucília, pela valiosa ajuda prestada durante a realização dos ensaios.

Ao aluno Leandro Lozano Gonçalves, que prestou enorme auxílio durante a execução dos experimentos.

Aos alunos do DEQ/UFSCar pela solidariedade durante a convivência no laboratório.

À Aninha pelo afeto.

Ao CNPq, PADCT / FINEP e PADCT / CAPES pelos auxílios financeiros que viabilizaram a pesquisa.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Aspectos gerais	6
3.2. Formulação do meio de cultura	8
3.2.1. Noções básicas sobre metabolismo primário e secundário	8
3.2.2. Influência de metionina, fontes de enxofre, carbono, fósforo e nitrogênio no metabolismo das linhagens de <i>C. acremonium</i>	11
3.2.3. Diferenciação morfológica	31
3.3. Reologia	34
3.3.1. Fluidos Newtonianos e escoamento laminar	42
3.3.2. Fluidos não-Newtonianos: pseudoplasticidade	45
3.3.3. Escoamentos turbulentos e complexos	50
3.3.4. Determinação das propriedades reológicas	51
3.3.4.1. Viscosímetro tipo capilar	51
3.3.4.2. Viscosímetro de cilindros coaxiais	52
3.3.4.3. Efeitos de deslizamento na parede e sedimentação da suspensão nos viscosímetros	56
3.3.5. Dados reológicos para fluidos de cultivo microbiano	59
3.3.5.1. Caldos miceliais	59
3.3.5.2. Controle das fermentações	60
3.3.5.3. Culturas de bactérias e leveduras	61
3.3.6. Mistura	62
3.3.7. Rendimento e produtividade em processos em batelada e em batelada alimentada	62

3.3.8. Processos em batelada e batelada alimentada	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1. Materiais	66
4.1.1. Microrganismos	66
4.1.1.1. Microrganismos para a produção de Cefalosporina C	66
4.1.1.2. Microrganismos para a determinação de Cefalosporina C	66
4.1.2. Meios de cultura	66
4.1.2.1. Meios de esporulação e manutenção	66
4.1.2.2. Meio de cultivo e manutenção do <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	67
4.1.2.3. Meios para as fermentações em frascos agitados	67
4.1.2.3.1. Meio para a germinação e para o preparo do inóculo	68
4.1.2.3.2. Meios para a fase de produção da Cefalosporina C	69
4.1.2.4. Meios para as fermentações realizadas em biorreator de tanque agitado	70
4.1.2.4.1. Meios para a germinação e preparação do inóculo	70
4.1.2.4.2. Meios para a fase de produção da cefalosporina C	70
4.1.3. Equipamentos	71
4.1.3.1. Esterilização	71
4.1.3.2. Incubadora	71
4.1.3.3. Câmara agitadora	71
4.1.3.4. Centrífuga refrigerada	71
4.1.3.5. Câmara asséptica	72
4.1.3.6. Biorreator do tipo tanque agitado e aerado	72
4.1.3.7. Microscópio com câmera fotográfica	73
4.1.3.8. Viscosímetro	73

4.2. Métodos.....	73
4.2.1. Métodos experimentais	73
4.2.1.1. Preparação do microrganismo	73
4.2.1.2. Preparação dos meios	74
4.2.1.3. Bioprocesso conduzido em frascos agitados para a produção de CPC	74
4.2.1.3.1. Germinação e preparação do inóculo.....	74
4.2.1.3.2. Fermentação para a biossíntese da CPC.....	75
4.2.1.4. Bioprocesso conduzido em biorreator do tipo tanque agitado.....	75
4.2.1.4.1. Germinação e obtenção de inóculo	75
4.2.1.4.2. Fermentação para a biossíntese da CPC.....	75
4.2.1.4.3. Operação em batelada alimentada.....	76
4.2.1.4.4. Operação em batelada	77
4.2.1.4.5. Procedimento para a coleta de amostras	77
4.2.2. Métodos Analíticos	77
4.2.2.1. Determinação de massa seca	77
4.2.2.2. Determinação de açúcares	78
4.2.2.2.1. Concentração dos açúcares redutores totais (ART)	78
4.2.2.2.2. Concentração dos açúcares redutores (AR).....	78
4.2.2.2.3. Concentração de glicose.....	78
4.2.2.2.4. Concentração de frutose	78
4.2.2.2.5. Concentração de sacarose	78
4.2.2.3. Determinação de CPC.....	78
4.2.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos e consumo de substrato.....	80
4.2.2.5. Acompanhamento das mudanças morfológicas das células.....	80
4.2.2.6. Caracterização reológica	80

4.2.2.6.1. Calibração dos cilindros	80
4.2.2.6.2. Determinações experimentais para a caracterização reológica e cálculo da viscosidade aparente	81
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1. Fermentações realizadas em frascos agitados.....	83
5.1.1. Resultados obtidos nos ensaios 14, 24 e 34	84
5.1.2. Resultados obtidos nos ensaios 11, 12, 13, 14 e 15.....	86
5.1.3. Resultados obtidos nos ensaios 21 a 25	88
5.1.4. Resultados obtidos nos ensaios de 31 a 35.....	90
5.2. Fermentações realizadas em biorreator de tanque agitado	116
5.2.1. Comparação do desempenho dos processos conduzidos em frascos agitados e em biorreator de tanque agitado em batelada e batelada alimentada.....	126
5.3. Caracterização reológica dos caldos de fermentação e morfologia.	128
6. CONCLUSÕES	141
7. SUGESTÕES	142
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

RESUMO

O bioprocesso para a obtenção de cefalosporina C foi realizado abordando os aspectos de composição do meio, produtividades específicas e caracterização reológica em processos conduzidos em batelada e batelada alimentada. O processo em batelada foi feito em frascos agitados e em reator do tipo tanque agitado de 5 litros, com controle de pH, temperatura, agitação e aeração. Nas fermentações em frascos agitados verificou-se a resposta da linhagem de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 em meio sintético, com diferentes fontes de carbono, empregando-se meios contendo glicose, frutose e sacarose. O meio com glicose e sacarose, na relação de 27:36 proporcionou à linhagem um melhor desempenho com relação à produtividade que foi de 0,18 mg_{CPC}/g_{cél.}h. Nos ensaios em biorreator de tanque agitado, em batelada, foi usada a relação de 27:36 de glicose e sacarose, e nos bioprocessos em batelada alimentada foi verificada a influência da relação da glicose e sacarose como fontes de carbono no meio empregando as relações 81:100; 27:126 e 26:187. A melhor produtividade específica obtida nos processos em batelada alimentada foi de 0,62 mg_{CPC}/g_{cél.}h para o cultivo glicose e sacarose na relação de 81:100. A produtividade específica do processo em batelada foi de 0,74 mg_{CPC}/g_{cél.}h para relação de glicose/sacarose de 27:36. A caracterização reológica dos caldos em viscosímetro de cilindros concêntricos apresentou, para cada bioprocessos estudado, comportamento Newtoniano e pseudoplástico, para tempos distintos de fermentação. O índice de consistência (K) atingiu valor máximo no intervalo entre 30 e 40 horas de fermentação, e o índice de escoamento (n) para todos os ensaios mostrou semelhantes valores. As fotomicrografias realizadas durante os processos mostraram uma correspondência entre as formas das células e as fases do processo: fase inicial de crescimento celular, fase de esgotamento de glicose e formação de cefalosporina C.

“Studies on cephalosporin C production: medium composition, specific productivities and rheological characterization in batch and fed-batch processes”

ABSTRACT

Bioprocess for cephalosporin C production in fed-batch fermentor was studied concerning medium composition, specific productivity and rheological characterization. The batch process was performed in shake flasks and in 5 liters stirred tank reactor provided with pH, temperature, aeration and agitation control. In the shake flask experiments the performance of the strain *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, was examined with media containing glucose, fructose and sucrose. The medium with glucose and sucrose at the ratio 27:36 enable the best behavior concerning specific productivity, 0.18 mg_{CPC}/g_{cél.}h. In the runs carried out in stirred tank biorreactor the 27:36 ratio for glucose and sucrose was utilized, while in the fed-batch experiments the effect of different glucose ratios, 81:100; 27:126; 26:187 was examined. The higher specific productivity (0.62 mg_{CPC}/g_{cél.}h) was observed for the experiment with 81:100 ratio glucose:sucrose. For the batch process with 27:36 glucose:sacarose ratio, the specific productivity was 0.74 mg_{CPC}/g_{cél.}h.

The rheological characterization of the mash were made in concentric cylinders viscometer. For each bioprocess it presented Newtonian and pseudoplastic behavior depending on the fermentation time. The consistency index (K) reached its maximum value between 30 and 40 hours fermentation time, while the flow behavior index (n) showed similar values for all experiments. The photomicrographs taken during the process showed a relationship between the three cell morphologies and the three bioprocess phases: initial phase, glucose depletion phase and cephalosporin C production phase.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Atividade da sulfatase e potência do antibiótico em cultura de <i>C. acremonium</i> com diferentes fontes de enxofre	20
Tabela 3.2: Resumo dos testes de isolamento de microrganismos.....	23
Tabela 3.3: Classificação das linhagens de <i>C. acremonium</i> produtoras de antibióticos β -lactâmicos	23
Tabela 3.4: Tipos morfológicos do <i>C. acremonium</i> . Fermentação em tanque agitado	39
Tabela 3.5: Efeito das medidas reológicas realizadas em tipos de equipamentos diferentes para predição dos coeficientes de transporte nos biorreatores.....	58
Tabela 4.1: Composição do meio sólido para a manutenção de <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 *	67
Tabela 4.2: Composição em (g/L) de meio sólido para a manutenção de <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750 *	67
Tabela 4.3: Esquema das combinações das fontes de carbono usadas nos meios para as tres etapas do bioprocessamento em frascos agitados.....	68
Tabela 4.4: Composição do meio de cultura básico para a germinação e preparação de inóculo empregado em todas as fermentações em frascos agitados *	68
Tabela 4.5: Relação quantitativa dos açúcares contidos no meio nutriente básico apresentados na Tabela 4.4.....	69
Tabela 4.6: Composição do meio nutriente básico empregado na fase de obtenção de CPC para todos os ensaios *	69
Tabela 4.7: Relação quantitativa dos açúcares contidos no meio básico apresentado na Tabela 4.6	70

Tabela 4.8: Concentração de glicose e sacarose empregadas no meio de cultura básico apresentado na Tabela 4.6 para os experimentos em tanque agitado na fase de obtenção de cefalosporina C	71
Tabela 4.9: Condições das operações em batelada alimentada.....	76
Tabela 4.10: Constantes de proporcionalidade k' e k'' , das equações 4.1 e 4.2.....	81
Tabela 5.1: Resultados das fermentações em frascos agitados realizadas com diversas combinações dos açúcares glicose (G), frutose (F) e sacarose (S), após 72 horas de processo. (Concentração inicial do meio de cultura, vide Tabela 4.7).....	84
Tabela 5.2: Resultados da fermentação 11, em que a glicose foi a única fonte de carbono, nas fases de preparo de inóculo e biossíntese do antibiótico	111
Tabela 5.3: Resultados da fermentação 12, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	111
Tabela 5.4: Resultados da fermentação 13, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e frutose foi usada na fase da biossíntese do antibiótico.....	111
Tabela 5.5: Resultados da fermentação 14, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	112
Tabela 5.6: Resultados da fermentação 15, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico	112
Tabela 5.7: Resultados da fermentação 21, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e glicose na fase da biossíntese do antibiótico.....	112
Tabela 5.8: Resultados da fermentação 22, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	113

Tabela 5.9: Resultados da fermentação 23, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e frutose na fase da biossíntese do antibiótico	113
Tabela 5.10: Resultados da fermentação 24, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	113
Tabela 5.11: Resultados da fermentação 25, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico	114
Tabela 5.12: Resultados da fermentação 31, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e glicose na fase da biossíntese do antibiótico	114
Tabela 5.13: Resultados da fermentação 32, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	114
Tabela 5.14: Resultados da fermentação 33, em que mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo, assim como na fase da biossíntese do antibiótico	115
Tabela 5.15: Resultados da fermentação 34, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico	115
Tabela 5.16: Resultados da fermentação 35, em que mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico	115
Tabela 5.17: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio A	116

Tabela 5.18: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio B	117
Tabela 5.19: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio C	117
Tabela 5.20: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas no processo fermentativo, em regime de batelada. Ensaio D.....	118
Tabela 5.21: Concentrações iniciais de glicose e sacarose empregadas em cada ensaio. Parâmetros cinéticos de crescimento estimados: $\mu_{\max 1}$; $\mu_{\max 2}$; $Y_{x/s1}$ e $Y_{x/s2}$. Ensaios A, B e C (batelada alimentada), ensaio D (batelada)	119
Tabela 5.22: Resultados das fermentações realizadas em frascos agitados e em fermentador tipo tanque agitado, que forneceram maiores produtividades. A (batelada alimentada); D (batelada); 14 (frascos agitados	126
Tabela 5.23: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio B	130
Tabela 5.24: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio C	133
Tabela 5.25: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio D.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Segmentação da importação brasileira de produtos medicinais em 1992 (Pereira Jr., 1996 <i>apud</i> Araujo, 1996).....	1
Figura 1.2: Segmentação da importação brasileira de antibióticos β -lactâmico em 1992 (Pereira Jr., 1996 <i>apud</i> Araujo, 1996).....	2
Figura 1.3: Esquema das interrelações entre os vários processos que ocorrem em uma fermentação fúngica de caldo viscoso (adaptado de Metz <i>et al.</i> , 1979).....	4
Figura 1.4: Relações entre a viscosidade da suspensão e os vários processos que ocorrem no reator tipo tanque agitado e aerado (adaptado de Metz <i>et al.</i> , 1979).....	4
Figura 3.1: Estrutura química da penicilina N. (adaptado de Bycroft e Shute, 1987).....	7
Figura 3.2: Estrutura química da cefalosporina C. (adaptado de Bycroft e Shute, 1987).....	8
Figura 3.3: Rota biossintética da cefalosporina C (Smith, 1985).....	10
Figura 3.4: Fermentação de cefalosporina C em tanque de 30 L, em meio sintético. \blacktriangle , glicose; \bullet , DL-metionina; \square , cefalosporina C; \diamond , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; \triangle , sacarose; \circ , massa celular. (Matsumura <i>et al.</i> , 1978).....	13
Figura 3.5: Produção de cefalosporina C com várias fontes de N e C na fase de produção. O micélio cresceu em meios nas condições: 0% (\square), 0,5% (\square com diagonal) e 1,0% (\blacksquare) de DL-metionina. O meio de produção continha 3,0% de glicose ou sacarose, e 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou DL-metionina e outros sais inorgânicos. Duração do processo 80 horas. (Matsumura <i>et al.</i> , 1978).....	13
Figura 3.6: Efeito dos carboidratos na produção de cefalosporina C. Foram empregados 2% de cada. (Matsumura <i>et al.</i> , 1978).....	14

- Figura 3.7: Efeito do suprimento de glicose intermitente para a produção de cefalosporina C. A fase de crescimento continha 1,5% de glicose, e durou 40 horas. A glicose foi alimentada nas concentrações mostradas na abscissa e a alimentação de sacarose foi feita em um caso para controle com 2%. (Matsumura *et al.*, 1978)..... 14
- Figura 3.8: Cultura contínua de *C. acremonium* M 8650 tendo a glicose como substrato limitante. (○) massa celular; ▲, glicose; (●) DL-metionina; (□) cefalosporina C. (Matsumura *et al.*, 1978)..... 15
- Figura 3.9: Variação da metionina intracelular nas células de *C. acremonium* CW19 durante uma fermentação para a produção de CPC. Meio sintético com 0,3% de DL-metionina. (○) massa celular; (△) DL-metionina; (□) cefalosporina C; (●) metionina intracelular. (Matsumura *et al.*, 1980b)..... 16
- Figura 3.10: Relação entre biossíntese de cefalosporina C e concentração de metionina intracelular no mutante SLP de *C. acremonium*. (Matsumura *et al.*, 1980b) 16
- Figura 3.11: Células de *C. acremonium* M8650 em suas várias diferenciações morfológicas. (A), número de hifas, fragmentos de hifas altamente inchados, artrosporos unicelulares esféricos e artrosporos unicelulares elipsoidais e cefalosporina C. (B), fragmentos de hifas moderadamente inchados, artrosporos elipsoidais, conídios e massa celular. (□) hifas; (■) maior que 50 μm ; (△) entre 25 a 50 μm ; (▲) 25 μm e menor; (○) artrosporos unicelulares; (◇) conidia; (●) cefalosporina C em A, ou massa celular em B. (Matsumura *et al.*, 1980a)..... 17
- Figura 3.12: Células de *C. acremonium* M8650 em meio sem metionina. (□) hifas; (■) maior que 50 μm ; (△) entre 25 a 50 μm ; (▲) 25 μm e menor; (○)

- artrosporos unicelulares; (\diamond) conidia; (\bullet) cefalosporina C em A, ou massa celular em B. (Matsumura *et al.*, 1980a)..... 18
- Figura 3.13: Síntese de cefalosporina C e formação dos artrosporos no *C. acremonium* M8650. O fungo cresceu em meios com várias concentrações de metionina. Cultivo de 4 dias. (\bullet , \circ) DL-metionina; (\blacktriangle , \triangle), D-metionina; (\blacksquare , \square) L-metionina. (Matsumura *et al.*, 1980a)..... 18
- Figura 3.14: Relação entre produção de antibiótico e atividade de sulfatase como função da concentração de metionina no meio de cultura de *C. acremonium*. Potência do antibiótico (\circ); atividade da sulfatase, μ moles *p*-nitrophenol liberada por min/mg_{cél} (\bullet). (Dennen e Carver, 1969) 20
- Figura 3.15: Relação entre síntese de antibiótico e atividade da sulfatase com a idade da cultura de *C. acremonium*. Potência do antibiótico (\circ); atividade da sulfatase, μ moles *p*-nitrophenol liberada por min/mL_{cél} (\bullet). (Dennen e Carver, 1969)..... 21
- Figura 3.16: Atividade de sulfatase em linhagens de *C. acremonium*, de diferentes potenciais para produzir antibiótico. (Dennen e Carver, 1969)..... 21
- Figura 3.17: Influência da cisteína e metionina como fonte de enxofre na produção de antibiótico por *C. acremonium*. (Dennen e Carver, 1969)..... 22
- Figura 3.18: Conversão do dímero do LLD-tripeptídeo a isopenicilina N e sua estimulação pelo FeSO₄. (Sawada *et al.*, 1980)..... 25
- Figura 3.19: Produção de enzima para ciclização pelo *C. acremonium* M-0198. (Sawada *et al.*, 1980) 26
- Figura 3.20: Efeito das concentrações de glicerol e glicose no crescimento de *C. acremonium* CW-19 e produção específica de antibiótico. (\square) meio de controle glicose/sacarose 27:36; (\blacktriangle) glicose (2,1%); (\circ) glicerol (2,1%); (\bullet) glicose (6,3%); (\triangle) glicerol (6,3%). (Behmer e Demain, 1983)..... 27

- Figura 3.21: Formação das enzimas ciclase e expandase em fermentação com meio sintético. a) *C. acremonium* CW-19; b) *C. acremonium* C-10. (▲) penicilina N; (●) glicose; (◇) expandase; (○) cefalosporina; (■) crescimento; (◆) ciclase; (×) antibióticos totais. (Shen *et al.*, 1986) 29
- Figura 3.22: Atividade da enzima para a síntese β -lactâmica de *C. acremonium* em função do tempo, em meios com diferentes açúcares. (Demain e Kennel, 1978) 30
- Figura 3.23: Crescimento, formação de antibiótico e atividade da sintetase do *C. acremonium* contendo diferentes concentrações de glicose. (□) concentração baixa de glicose (○) concentração intermediária de glicose (△) concentração alta de glicose (Demain e Kennel, 1978) 31
- Figura 3.24: Diagrama esquemático da morfologia fúngica e suas transições para a produção de cefalosporina C pelo *C. acremonium* (Matsumura, 1981) 32
- Figura 3.25: Modelos reológicos. (Metz *et al.*, 1979b) 35
- Figura 3.26: Características reológicas do caldo de fermentação em biorreator tipo tanque. Viscosidade aparente, índice de escoamento e concentração de células em função do tempo. (Kim e Yoo, 1992) 39
- Figura 3.27: Reograma para cada tipo morfológico celular. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. Taxa de cisalhamento e viscosidade aparente em função da taxa de deformação. (Kim e Yoo, 1992) 40
- Figura 3.28: Índices de consistência para cada tipo morfológico em função da concentração de células. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. (Kim e Yoo, 1992) 40

Figura 3.29: Comparação dos índices de consistência de cada tipo morfológico com o índice de consistência do caldo fermentativo. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. (Kim e Yoo, 1992)	41
Figura 3.30: (a) Escoamento laminar entre cilindros concêntricos de curvatura desprezível. (b) Perfil de velocidade. (adaptado de Charles, 1978)	43
Figura 3.31: Fluido pseudoplástico. (a) curva de escoamento e (b) característica da viscosidade	46
Figura 3.32: Taxa de deformação em função da velocidade do impulsor a várias distâncias da extremidade da turbina. (adaptado de Charles, 1978).....	47
Figura 3.33: Taxa de deformação (s^{-1}) em função da velocidade de agitação (rpm) em várias distâncias do impulsor da turbina. (adaptado de Charles, 1978).....	48
Figura 4.1: Esquema geral do equipamento utilizado	72
Figura 5.1: Resultados da produtividade específica alcançada nos experimentos realizados em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F)	93
Figura 5.2: Resultados da produtividade específica alcançada nos experimentos realizados em frascos agitados. O meio de germinação continha sacarose. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F)	94
Figura 5.3: Produtividade específica atingida nos experimentos realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).....	95
Figura 5.4: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F).....	96
Figura 5.5: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).....	97

Figura 5.6: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F)	98
Figura 5.7: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF) e 14 (G-GS)	99
Figura 5.8: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF) e 24 (S-GS).....	100
Figura 5.9: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF) e 34 (GF-GS) ..	101
Figura 5.10: Concentração de sacarose medida durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 12 (G-S) e 14 (G-GS)	102
Figura 5.11: Concentração de sacarose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).....	103
Figura 5.12: Concentração de sacarose medida durante os ensaios de frascos agitados. Ensaios 32 (GF-S) e 34 (GF-GS).....	104
Figura 5.13: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F).....	105
Figura 5.14: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).....	106
Figura 5.15: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F)	107
Figura 5.16: Concentração de frutose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 12 (G-S), 13 (G-GF) e 15 (G-F).....	108

Figura 5.17: Concentração de frutose dosada durante os ensaios realizados em fracos agitados. Ensaios 22 (S-S), 23 (S-GF) e 25 (S-F).....	109
Figura 5.18: Concentração de frutose dosada nos ensaios de fracos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).....	110
Figura 5.19 Ensaio A. Concentrações de massa seca (C_x , \circ), sacarose (\times), glicose (Δ) e produtividade específica de CPC (*). Vazão suplementar de sacarose 0,36 mL/min.....	122
Figura 5.20: Ensaio B. Concentrações de massa seca (C_x , \circ), sacarose (\times), glicose (Δ) e produtividade específica de CPC (*). Vazão suplementar de sacarose 0,24 mL/min.....	123
Figura 5.21: Ensaio C. Concentrações de massa seca (C_x , \circ), sacarose (\times), glicose (Δ) e produtividade específica de CPC (*). Vazão suplementar de sacarose 0,33 mL/min.....	123
Figura 5.22: Ensaio D. Concentrações de massa seca (C_x , \circ), sacarose (\times), glicose (Δ) e produtividade específica de CPC (*)......	124
Figura 5.23: Concentração de CPC obtida nos ensaios no fermentador. A (\square), B (\circ) e C (Δ) (fermentações em batelada alimentada). D (∇) (fermentação em batelada)	124
Figura 5.24: Produtividade específica obtida nos ensaios realizados no fermentador. A (\square), B(\circ) e C(Δ) (fermentações em batelada alimentada). D (∇) (fermentação em batelada)	125
Figura 5.25: Produtividade obtida nos ensaios realizados em fermentador. A (\square), B (\circ) e C (Δ) (fermentações em batelada alimentada). D (∇) (fermentação em batelada).....	125

Figura 5.26: Produtividade específica em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.....	127
Figura 5.27: Produtividade em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.....	128
Figura 5.28: CPC em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.....	128
Figura 5.29: Ensaio B. Massa seca (C_X), índice de consistência (K), e K/C_X em função do tempo. (\circ) K; (\diamond) C_X ; (∇) K/C_X	129
Figura 5.30: Ensaio B. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (\circ) K; (\square) viscosidade; (\triangle) rpm.....	130
Figura 5.31: Ensaio B. Massa seca (C_X), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (\circ) K; (\diamond) C_X ; (+) n.....	130
Figura 5.32: Ensaio C. Massa seca (C_X), índice de consistência (K), e K/C_X em função do tempo. (\circ) K; (\diamond) C_X ; (∇) K/C_X	131
Figura 5.33: Ensaio C. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (\circ) K; (\square) viscosidade; (\triangle) rpm.....	132
Figura 5.34: Ensaio C. Massa seca (C_X), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (\circ) K; (\diamond) C_X ; (+) n.....	132
Figura 5.35: Ensaio D. Massa seca (C_X), índice de consistência (K), e K/C_X em função do tempo. (\circ) K; (\diamond) C_X ; (∇) K/C_X	133

- Figura 5.36: Ensaio D. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (○) K; (□) viscosidade; (△) rpm 134
- Figura 5.37: Ensaio D. Massa seca (C_x), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (○) K; (◇) C_x ; (+) n..... 134
- Figura 5.38: Índice de escoamento (n) em função do tempo. Ensaios B (—), C (- - -) e D (.....)..... 136
- Figura 5.39: K/C_x em função do tempo. Ensaios B (—), C (- - -) e D (.....) 136
- Figura 5.40: Fotomicrografias de células fúngicas em 24 horas de fermentação. Hifas filamentosas típicas do início do processo. Foram utilizadas em (a) objetiva 20X/0,50 e em (b) objetiva 40X/0,75..... 138
- Figura 5.41: Fotomicrografias de células fúngicas em 37 horas de fermentação. Fragmentos intumescidos de hifas, típicos da fase em que a concentração celular tende a um valor constante coincidindo com o aumento exponencial do índice de consistência do caldo e com o esgotamento da glicose. Foram utilizadas em (a) e (b) objetiva 100X/1,30..... 139
- Figura 5.42: Fotomicrografias de células fúngicas em 120 horas de fermentação. Artrosporos e conídios típicos do fase de formação da cefalosporina. Foi utilizada em (a) e (b) objetiva 100X/1,30 140

NOMENCLATURA

C_X	Concentração celular ($M.L^{-1}$)
Pr_{esp}	Produtividade específica ($mg_{CPC}/g_{cél}.h$)
Pr	Produtividade ($M.L^{-1}.T^{-1}$)
CPC	Concentração de cefalosporina C ($M.L^{-1}$)
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação (T^{-1})
τ	Taxa de cisalhamento ($M.L^{-1}.T^{-2}$)
k	Fator de proporcionalidade entre $\dot{\gamma}$ e N
K	Índice de consistência ($M.L.T^{-2}.T^n.L^{-2}$)
n	Índice de escoamento
N	Velocidade da haste do impulsor do biorreator (rpm)
μ_{ap}	Viscosidade aparente ($M.L^{-1}.T^{-1}$)
$Y_{x/s1}$	Fator de rendimento relativo à biomassa formada (células do tipo X_1) durante o consumo de glicose ($M.M^{-1}$)
$Y_{x/s2}$	Fator de rendimento relativo à biomassa formada (células do tipo X_2) durante o consumo de sacarose ($M.M^{-1}$)
$\mu_{máx1}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular em glicose (T^{-1})
$\mu_{máx2}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular em sacarose (T^{-1})

1. INTRODUÇÃO

A cefalosporina C, CPC, é um metabólito secundário que faz parte do grupo dos antibióticos β -lactâmicos. Este composto pode ser obtido industrialmente por via bioquímica empregando fungos do gênero *Cephalosporium*. A cefalosporina C é usada como matéria prima para a obtenção de um grande número de cefalosporinas quimicamente modificadas, que possuem alto valor comercial devido à sua ampla atividade antibacteriana (Smith, 1985; Wick, 1972; O'Callaghan e Muggleton, 1972).

A demanda pela cefalosporina C e sua importância são mostradas pelos dados do mercado mundial. Em 1980 as cefalosporinas ocuparam o primeiro lugar com vendas, cerca de US\$ 1,75 bilhões (29% do mercado total) (Smith, 1985). Em 1985, o mercado de cefalosporina C nos USA foi de US\$ 1,2 bilhões de um total do mercado de antibióticos de US\$ 2,5 bilhões (Chu e Constatinides, 1988 *apud* Araujo, 1996). Pereira Jr, (1986 *apud* Araujo, 1996) apresenta fontes em que os antibióticos β -lactâmicos atualmente mais importados no Brasil são as penicilinas e as cefalosporinas, e que em 1992 as cefalosporinas chegaram a ocupar 36% do valor FOB total das importações brasileiras de antibióticos. As segmentações das importações brasileiras de produtos medicinais e de antibióticos β -lactâmico em 1992 estão apresentadas nas figuras 1.1 e 1.2.

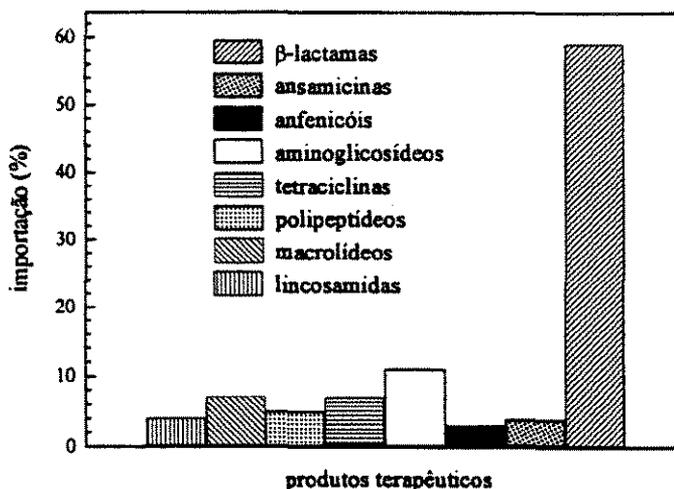


Figura 1.1: Segmentação da importação brasileira de produtos medicinais em 1992 (Pereira Jr., 1996 *apud* Araujo, 1996).

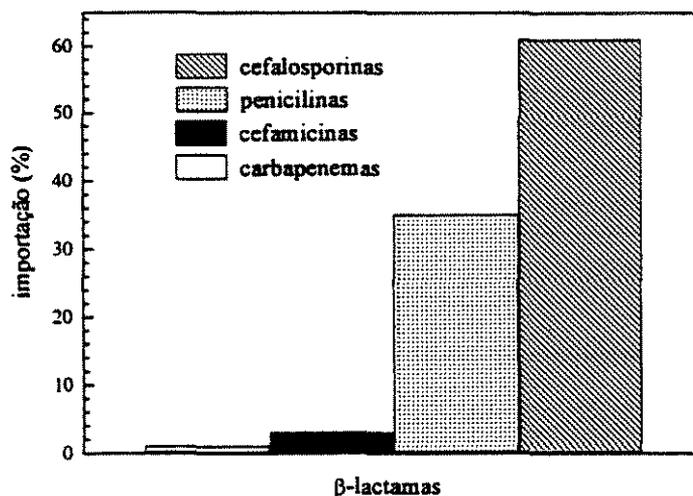


Figura 1.2: Segmentação da importação brasileira de antibióticos β -lactâmico em 1992 (Pereira Jr., 1996 *apud* Araujo, 1996).

O *Cephalosporium* pertence ao grupo dos fungos imperfeitos e se reproduz por duas formas de esporos assexuais, que são as conídios e os artrosporos. As conídios típicos se apresentam como estruturas oblongas com o comprimento cerca de 15 μm e largura de 8 μm atingindo um volume de 5,06 μm^3 (Pisano, 1963 *apud* Nash *et al.*, 1985). Eles sofrem separações sucessivas e mantêm uma secreção viscosa em uma das extremidades designada por cabeça. Os artrosporos são formados por estruturas arredondadas de um ou mais segmentos de hifas, seguido pelo espessamento da parede celular. As hifas filamentosas são organizadas como segmentos uninucleados (Treichler *et al.*, 1972 e Hamlyn, 1982 *apud* Nash *et al.*, 1985).

Fungos da espécie *Cephalosporium acremonium* possuem hifas e esporos e crescem em meio sólido formando um grande número de conídios e conidióforos. Em geral produzem um pigmento solúvel amarelo que se difunde no meio sólido. Em culturas submersas eles apresentam quatro tipos morfológicos de células: hifas, fragmentos de hifas entumescidos, artrosporos e conídios que representam estágios distintos no ciclo de crescimento (Nash e Huber, 1971). Alguns autores afirmam que a diferenciação das hifas em artrosporos multicelulares e unicelulares é mais evidente nas linhagens mutantes, boas produtoras de antibiótico (Queener e Ellis, 1975 *apud*

Demain e Kennel, 1978; Matsumura *et al.*, 1980a; Drew *et al.*, 1976 *apud* Nash *et al.*, 1985).

A literatura apresenta variadas investigações sobre a produção de cefalosporina C a partir de linhagens mutantes de *C. acremonium* em que são abordadas não só influências de alguns compostos no metabolismo secundário, assim como são examinadas as fermentações fúngicas submersas conduzidas em frascos agitados, em tanques aerados, e em reator tipo torre "airlift" (Demain, 1983; Carver e Dennen, 1968 *apud* Dennen e Carver, 1969; Heim *et al.*, 1984; Hilgendorf *et al.*, 1987). Em paralelo, acontecem os estudos para a determinação reológica dos caldos das fermentações submersas e a associação com a diferenciação morfológica das células fúngicas ao longo do processo.

A obtenção industrial de cefalosporina C, em geral, tem sido realizada via cultura submersa em reatores tipo tanque agitado e aerado, que produzem caldos com alta viscosidade e comportamento não-Newtoniano, que se não controlada prejudica o desempenho do biorreator.

As figuras 1.3 e 1.4 apresentam de forma esquemática as relações que ocorrem entre a viscosidade e os vários processos em uma fermentação fúngica. Tais relações justificam a realização do presente trabalho, que foi dirigido para o estudo de fermentações submersas para produção de cefalosporina C. Os cultivos foram realizados em frascos agitados e em biorreator de tanque agitado operando-se em batelada alimentada e em batelada.

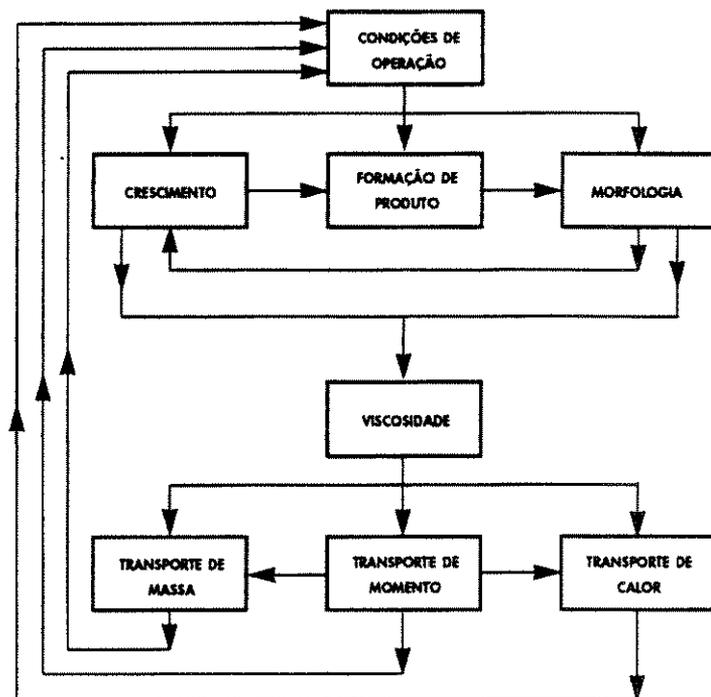


Figura 1.3: Esquema das interações entre os vários processos que ocorrem em uma fermentação fúngica de caldo viscoso (adaptado de Metz *et al.*, 1979)

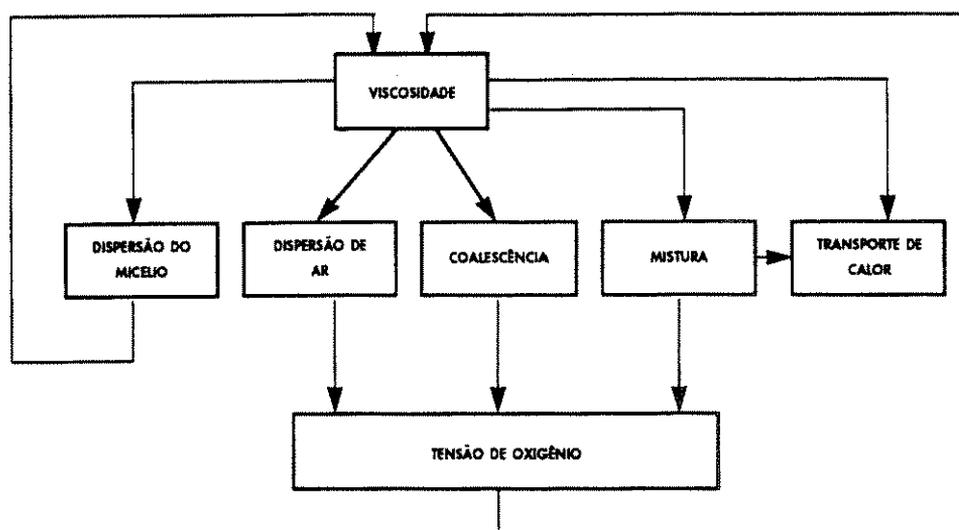


Figura 1.4: Relações entre a viscosidade da suspensão e os vários processos que ocorrem no reator tipo tanque agitado e aerado (adaptado de Metz *et al.*, 1979).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi examinar a influência da frutose, glicose e sacarose e suas combinações, em fermentações submersas em frascos agitados com *C. acremonium* para obtenção de cefalosporina C.

Investigar a influência das concentrações de glicose e sacarose na produtividade específica de cefalosporina C em bioprocessos conduzidos em regime de batelada alimentada

Realizar a caracterização reológica dos caldos fermentativos dos bioprocessos realizados em tanque agitado

Analisar a diferenciação morfológica do fungo por meio de fotomicrografias juntamente com os parâmetros reológicos obtidos.

Realizar estudo comparativo das produtividades específicas obtidas nas fermentações submersas realizadas em frascos agitados e em biorreator de tanque agitado em regime de batelada e de batelada alimentada..

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais

A descoberta e desenvolvimento das cefalosporinas começou no período pós guerra com a observação sobre um organismo que apresentou atividade biológica sobre determinadas bactérias tendo sido isolado da água do mar próximo a um esgoto em Cagliari na Sardenha (Brotzu, 1948 e Bycroft e Shute, 1987 *apud* Moss, 1987). Este micróbio foi identificado como fungo *Cephalosporium acremonium*. O cultivo da linhagem de *C. acremonium* isolada por Brotzu em 1945 produziu cefalosporina C em quantidade muito pequena, juntamente com esta foi detectada a presença da cefalosporina N, hoje conhecida como penicilina N (Abraham *et al.*, 1955 *apud* Abraham e Loder, 1972). Os filtrados da cultura de *C. acremonium* sp. foram testados clinicamente na Sardenha, foram injetados diretamente em lesões estafilocócicas e estreptocócicas (furúnculos e abscessos) dando bons resultados. Os concentrados ativos foram também ministrados por via intravenosa e intramuscular a indivíduos com febre tifóide, infecções paratifóides e brucelose, também dando resultados animadores, especialmente quanto a febre tifóide (Brotzu, 1948, *apud* Abraham e Loder, 1972). Considerando os resultados alcançados, Brotzu ao final de sua pesquisa percebeu que era importante a continuação dos trabalhos para o isolamento do princípio ativo do antibiótico descoberto, cuja realização estava além de seus conhecimentos. Brotzu enviou uma cultura do seu microrganismo para Oxford em 1948, mas somente após vinte anos ocorreram estudos suficientes para o estabelecimento da aplicação medicinal do produto.

Durante os estudos em Oxford em 1949 com a linhagem *C. acremonium* C.M. I. 49137 de Brotzu, foi obtido um primeiro concentrado de antibiótico, denominado como cefalosporina P que apresentou atividade biológica contra bactérias gram-positivas, diferente do antibiótico descrito por Brotzu. Ainda neste ano foi obtido um segundo antibiótico a cefalosporina N com atividade contra bactérias gram negativas

e gram positivas (Burton e Abraham, 1951 e Crawford *et al.*, 1952 *apud* Abraham e Loder, 1972). Em 1952 Abraham e Newton (*apud* Abraham e Loder, 1972) concluíram que a cefalosporina N era um novo tipo de penicilina, por apresentar anéis tiazolidina e β -lactâmico unidos. A cefalosporina N passou a ser chamada de penicilina N.

A figura 3.1 mostra a estrutura da penicilina N constituída de dois anéis que caracterizam as penicilinas.

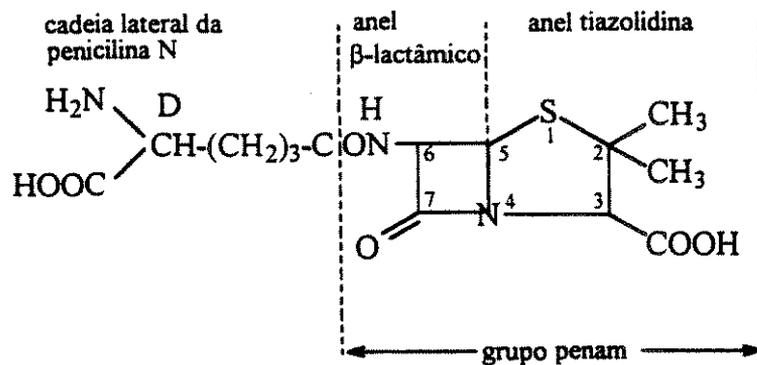


Figura 3.1: Estrutura química da penicilina N. (adaptado de Bycroft e Shute, 1987)

Newton e Abraham (1953, *apud* Abraham e Loder, 1972) descobriram um segundo antibiótico hidrofílico entre os metabólitos produzidos pelo microrganismo isolado por Brotzu, denominado por cefalosporina C, esta foi encontrada durante os estudos químicos da penicilina N em pequenas quantidades. Em 1955 foi visto que a cefalosporina C possuía uma atividade biológica ampla, e que era eficaz contra muitas linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Posteriormente, com a continuidade das pesquisas, a estrutura química proposta por Abraham e Newton (1961 *apud* Bycroft e Shute, 1987) foi confirmada por Hodgkin e Maslen (1961 *apud* Bycroft e Shute, 1987). A diferença entre penicilina N e cefalosporina C residia na substituição do anel tiazolidina pelo anel dihidrotiazina e pela presença de um grupo cephem (Bycroft e Shute, 1987) como pode ser visto na figura 3.2.

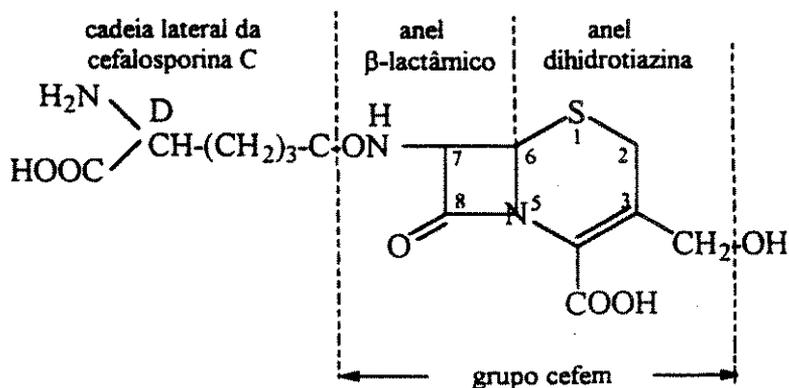


Figura 3.2: Estrutura química da cefalosporina C. (adaptado de Bycroft e Shute, 1987)

Em função dos avanços, com relação à importância da cefalosporina C, os estudos para melhoramento genético das linhagens foram se desenvolvendo com o objetivo de conseguir linhagens com boa capacidade produtiva, para posterior estudo do bioprocessamento em grande escala.

3.2. Formulação do meio de cultura

3.2.1. Noções básicas sobre metabolismo primário e secundário

Para o desenvolvimento do estudo de um bioprocessamento há a necessidade de um aprofundamento quanto às exigências nutricionais da linhagem que está sendo empregada, juntamente com a compreensão de noções básicas dos metabolismos primário e secundário que ocorrem com os microrganismos, o que justifica a otimização da composição dos meios nutrientes para cada linhagem. A literatura apresenta trabalhos que relacionam não só o efeito de determinados compostos no metabolismo secundário do fungo para a produção do antibiótico, mas também acenam para a possibilidade de algum componente influenciar a diferenciação morfológica do *C. acremonium* no seu ciclo vegetativo que ocorre durante o processo fermentativo (Mantle, 1987; Matsumura *et al.*, 1978, 1980a e 1980b; Drew e Demain, 1977; Huber e Tietz, 1983).

Durante o crescimento celular, os microrganismos conseguem por meio de várias reações bioquímicas transformar as fontes complexas de carbono e energia, os produtos finais obtidos deste processo são reorganizados para dar origem aos produtos intermediários primários como os aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos. Desses intermediários resultam os metabólitos essenciais que constituem a estrutura e as funções biológicas dos microrganismos. Estas atividades resultantes das reações bioquímicas de “quebra” e de biossíntese interligadas exprimem o metabolismo primário, os produtos deste metabolismo raramente são acumulados, e têm funções determinadas. Em seguida, um processo posterior ao do crescimento celular, denominado de metabolismo secundário origina o aparecimento de compostos que aparentemente não são essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos microrganismos e que, por isso se acumulam no meio de cultivo (Martin e Demain, 1978; Demain, 1971). Alguns pesquisadores interpretam o metabolismo secundário como uma expressão da diferenciação que acompanha o crescimento desbalanceado e que os produtos deste processo tenham alguma função relacionada com a sobrevivência do microrganismo (Drew e Demain, 1977; Demain, 1984).

Os processos biossintéticos, que ocorrem nos microrganismos resultantes do metabolismo primário e secundário acontecem de forma complexa por meio da competição por intermediários metabólicos chaves (Demain, 1984). Embora se tenha informações sobre um grande número de metabólitos secundários, estes geralmente são sintetizados a partir de um pequeno número de precursores chaves, por etapas que envolvem poucas reações desviadas do metabolismo primário em um número limitado de pontos da rota biossintética (Mantle, 1987; Bu'Lock, 1961 e 1965 *apud* Martin e Demain, 1978).

A literatura apresenta vários trabalhos a respeito da evolução das pesquisas sobre a formação da cefalosporina C. A etapa inicial compreende o agrupamento dos três aminoácidos que são a cisteína, a valina e o ácido α -aminoadípico (α -AAA) para a formação do tripeptídeo δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina. A sua formação ocorre em actinomicetos e fungos e é o precursor obrigatório dos antibióticos β -

lactâmicos. A rota biossintética para a formação da cefalosporina C a partir dos três aminoácidos mencionados está apresentado na figura 3.3.

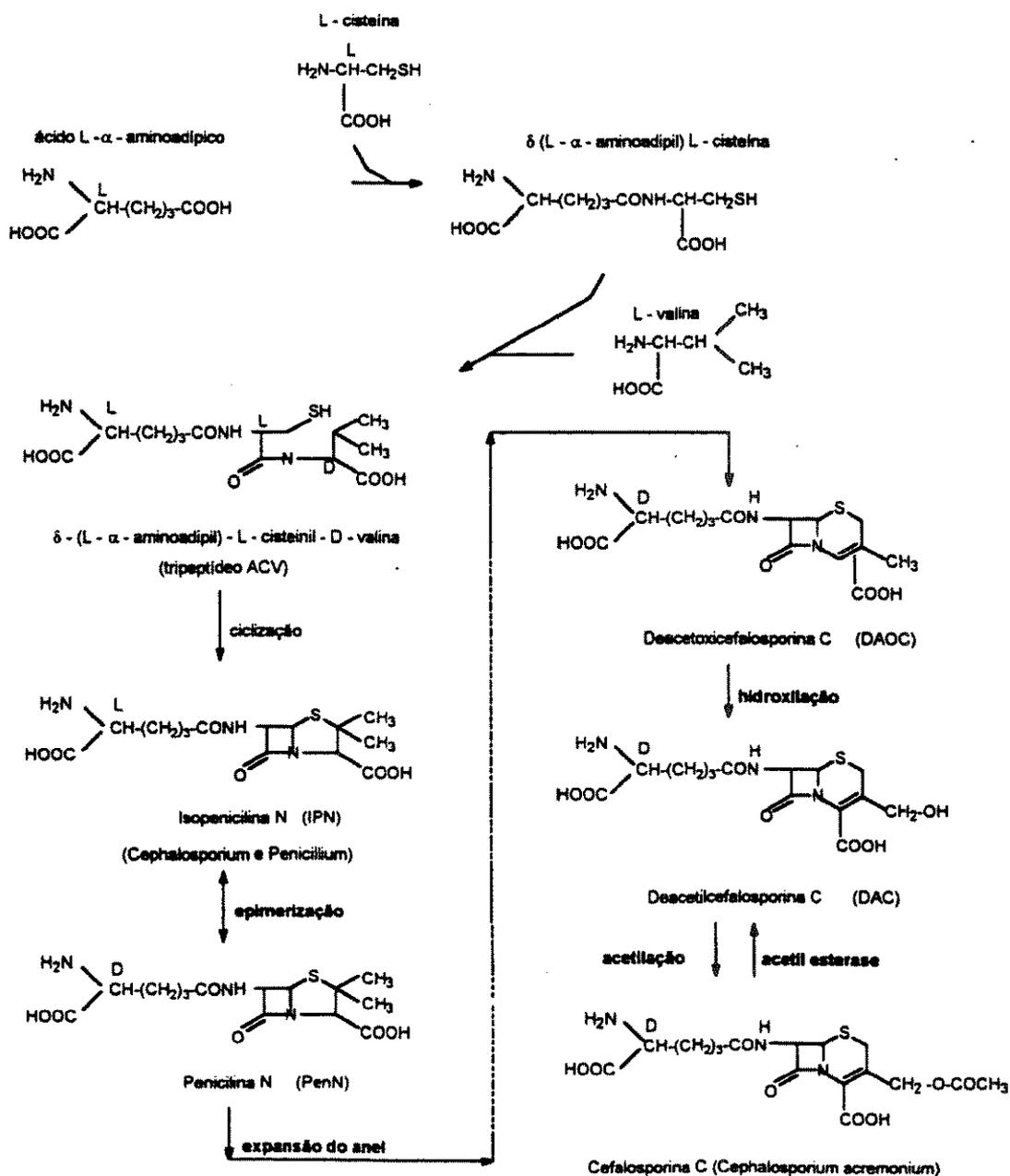


Figura 3.3: Rota biossintética da cefalosporina C (Smith, 1985).

Quando há interesse comercial na produção de metabólitos secundários, o processo deve ser controlado de forma a se acumular os mesmos em grandes quantidades. A regulação da biossíntese dos metabólitos secundários envolve mecanismos de indução,

regulação por retroalimentação e regulação catabólica, da mesma forma que ocorre para a obtenção de metabólito primário (Martin e Demain, 1978).

3.2.2. Influência de metionina, fontes de enxofre, carbono, fósforo e nitrogênio no metabolismo das linhagens de *C. acremonium*

Por ser a cefalosporina C um metabólito secundário, muitos estudos têm sido feitos sobre a participação de compostos presentes no meio de fermentação, para a melhoria do controle das reações que acontecem para a sua produção, como pode ser visto na figura 3.3.

Solomons (1969) apresentou em sua literatura um vasto material sobre a constituição dos vários compostos empregados nos meios de cultivo que serviram de base para os ajustes das composições do meio de cultivo para a linhagem *C. acremonium* C-10.

Demain *et al.* (1963) estudaram o efeito da metionina, norleucina e derivados da lisina na produção de cefalosporina C com um mutante do *C. acremonium* sp.49137, a linhagem 8650. Os autores observaram que a metionina produziu um efeito positivo, e a sua ação estimuladora tinha lugar na fase de crescimento do fungo. A produção de cefalosporina C não foi afetada pela substituição da metionina pela norleucina e quanto aos derivados da lisina não foi observado efeito.

Caltrider e Niss (1966) empregaram a linhagem *C. acremonium* CW-19 para estudar o efeito da metionina e concluíram que a metionina deveria ser introduzida após a fase de crescimento celular e acenaram que, a metionina era o precursor do átomo de enxofre do núcleo da molécula da cefalosporina C, apesar de L-cisteína ser precursor mais próximo do núcleo do antibiótico. Os autores verificaram que na presença de sulfato e metionina, o microrganismo apresentou preferência pela metionina.

Drew e Demain (1973) trabalharam com a linhagem de *C. acremonium* CW-19, em meios quimicamente definidos com e sem metionina, confirmando que a metionina era precursora da molécula da cefalosporina C. Os autores também constataram que a norleucina substituiu a metionina, e que portanto haveria um

mecanismo comum, e que seus efeitos estimulatórios eram aditivos em concentrações baixas. Drew e Demain (1973) sugeriram que o papel da metionina deve ser regulador reprimindo ou inibindo a enzima cisteína desulfidrilase, que é a precursora imediata de enxofre da cefalosporina C. Estudos comparativos sobre o efeito da metionina para produção de cefalosporina C (Kitano *et al.*, 1977) mostraram que fungos do gênero *Cephalosporium* eram estimulados pela metionina. Em outras linhagens de *Cephalosporium chrysogenum* e de *C. acremonium* os autores observaram que a presença de sulfato de sódio provocou uma leve estimulação em algumas linhagens e inibição em outras linhagens para a formação de cefalosporina C. Quanto ao efeito da cisteína, foi observado pelos autores que a mesma era um precursor direto de penicilina e cefalosporinas, apesar de apresentar pequeno estímulo para algumas linhagens de *C. acremonium*.

Lewandowska e Paszewski (1988) trabalharam com linhagens de *C. acremonium* produtores de cefalosporina C para examinar os níveis e a regulação de várias enzimas do metabolismo de enxofre e a relação da produtividade com o metabolismo de enxofre para cada linhagem. Os resultados mostraram que a metionina reprimiu o sulfato nas três linhagens, porém para a linhagem mais produtiva necessitou das duas fontes de enxofre no meio para atingir a produção máxima.

Os efeitos da metionina e dos açúcares, glicose e sacarose, foram estudados por Matsumura *et al.* (1978) na produção de cefalosporina C por *C. acremonium* M8650 em meio sintético com operações em batelada, batelada alimentada e contínua. Os resultados mostraram que a glicose (açúcar de fácil assimilação) reprimiu as enzimas do metabolismo secundário, e que a sacarose (de lento consumo) permitiu a síntese do antibiótico mostrando produção dissociada do crescimento. Foi confirmado que a velocidade de produção e a de acúmulo de cefalosporina C independeram da velocidade de consumo da metionina. Além disso outras fontes de carbono foram testadas revelando que a glicose e lactose forneceram as concentrações maiores de antibiótico. Os autores também observaram no microscópio as mudanças características da morfologia do microrganismo. Na fase de crescimento houve a presença de hifas finas, e na fase do consumo de sacarose aconteceu a

diferenciação das hifas para fragmentos intumescidos e altamente septados. As figuras 3.4. a 3.8 mostram os resultados obtidos.

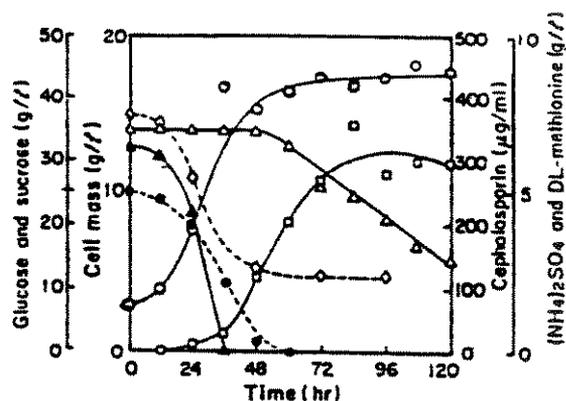


Figura 3.4: Fermentação de cefalosporina C em tanque de 30 L, em meio sintético. ▲, glicose; ●, DL-metionina; □, cefalosporina C; ◇, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; △, sacarose; ○, massa celular. (Matsumura *et al.*, 1978)

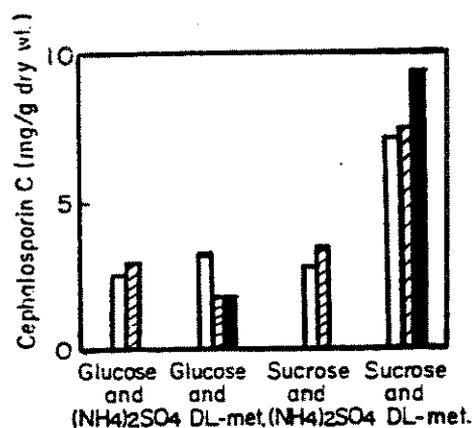


Figura 3.5: Produção de cefalosporina C com várias fontes de N e C na fase de produção. O micélio cresceu em meios nas condições: 0% (□), 0,5% (▨) e 1,0% (■) de DL-metionina. O meio de produção continha 3,0% de glicose ou sacarose, e 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou DL-metionina e outros sais inorgânicos. Duração do processo 80 horas. (Matsumura *et al.*, 1978)

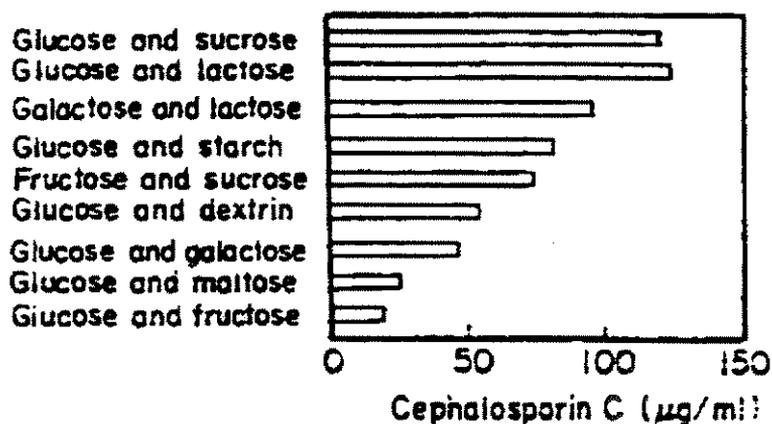


Figura 3.6: Efeito dos carboidratos na produção de cefalosporina C. Foram empregados 2% de cada. (Matsumura *et al.*, 1978)

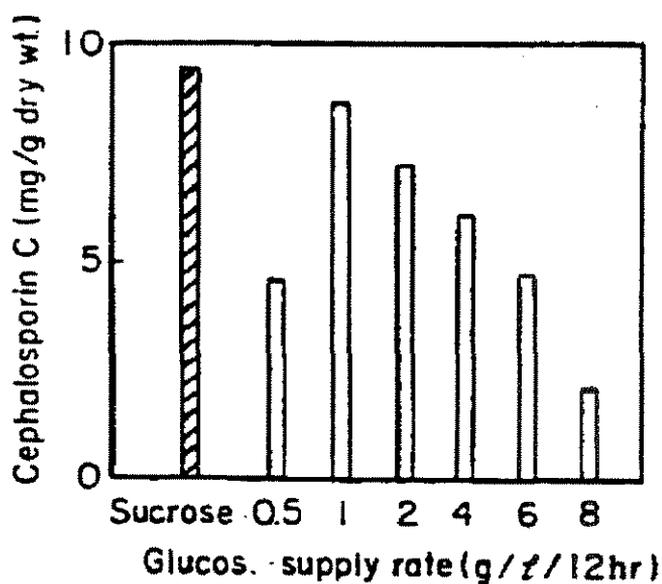


Figura 3.7: Efeito do suprimento de glicose intermitente para a produção de cefalosporina C. A fase de crescimento continha 1,5% de glicose, e durou 40 horas. A glicose foi alimentada nas concentrações mostradas na abscissa e a alimentação de sacarose foi feita em um caso para controle com 2%. (Matsumura *et al.*, 1978)

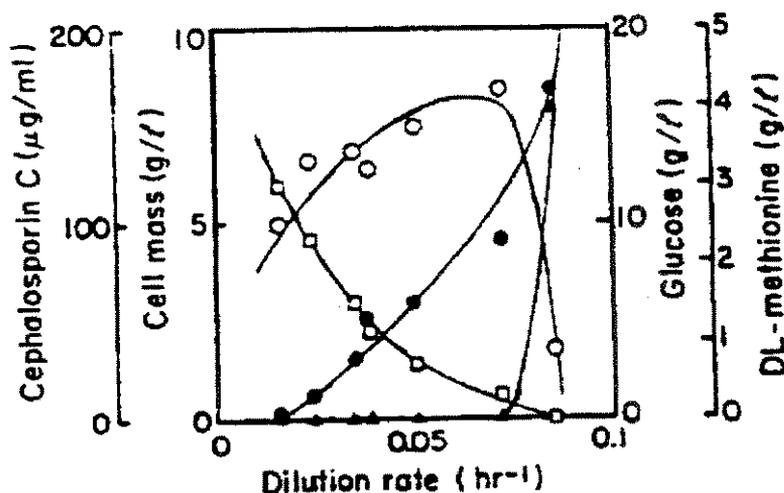


Figura 3.8: Cultura contínua de *C. acremonium* M 8650 tendo a glicose como substrato limitante. (○) massa celular; ▲, glicose; (●) DL-metionina; (□) cefalosporina C. (Matsumura *et al.*, 1978)

Matsumura *et al.* (1980b) estudaram a regulação da produção de cefalosporina C pela metionina endógena em duas linhagens de *C. acremonium* a CW-19 e uma mutante SLP em meio sintético, os resultados mostraram um aumento temporário na concentração da metionina endógena na fase de crescimento. Os autores confirmaram a dependência entre concentração intracelular de metionina e produção de cefalosporina C indicando indução das enzimas que sintetizam a cefalosporina C, e verificaram que o aumento da metionina suplementada ao meio não competiu com a repressão catabólica pela glicose sobre as enzimas biossintetizantes de antibiótico. Estes efeitos são mostrados nas figuras 3.9 e 3.10.

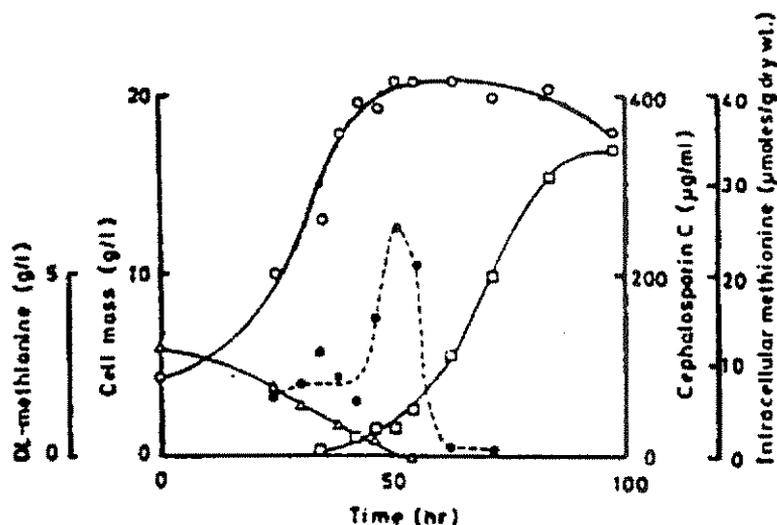


Figura 3.9: Variação da metionina intracelular nas células de *C. acremonium* CW19 durante uma fermentação para a produção de CPC. Meio sintético com 0,3% de DL-metionina. (○) massa celular; (△) DL-metionina; (□) cefalosporina C; (●) metionina intracelular. (Matsumura *et al.*, 1980b)

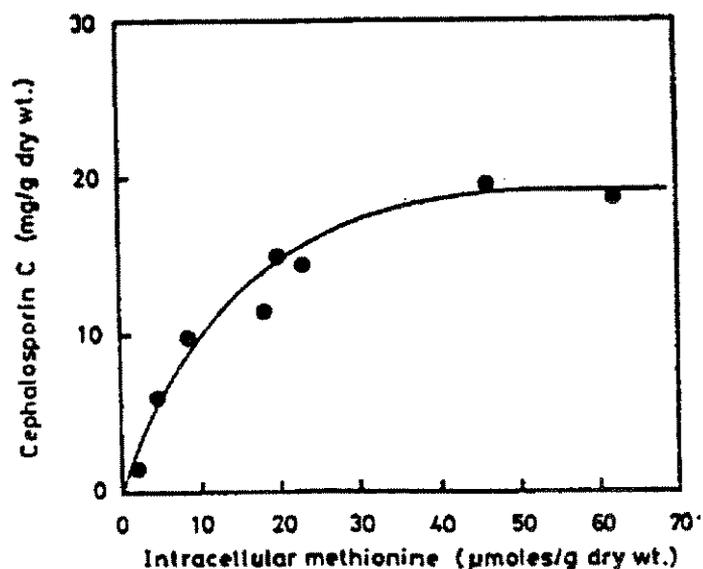


Figura 3.10: Relação entre biossíntese de cefalosporina C e concentração de metionina intracelular no mutante SLP de *C. acremonium*. (Matsumura *et al.*, 1980b)

Com o objetivo de buscar uma relação entre síntese de cefalosporina C e morfologia do *C. acremonium* Matsumura *et al.* (1980a) realizaram um estudo comparativo com duas linhagens M 8650 e CW-19, realizando o processo em

batelada, e usando as fontes de carbono glicose e sacarose (Demain *et al.* 1963). Os resultados mostraram que a linhagem mais produtiva, CW-19, apresentou maior capacidade de acumular a metionina intracelular no intervalo entre o esgotamento da glicose e o início do consumo da sacarose, e que no tempo de maior atividade das enzimas biossintetizantes foram observadas as células na forma de fragmentos de hifas intumescidas e altamente septadas com grande concentração de metionina endógena. As figuras 3.11, 3.12 e 3.13 mostram os resultados

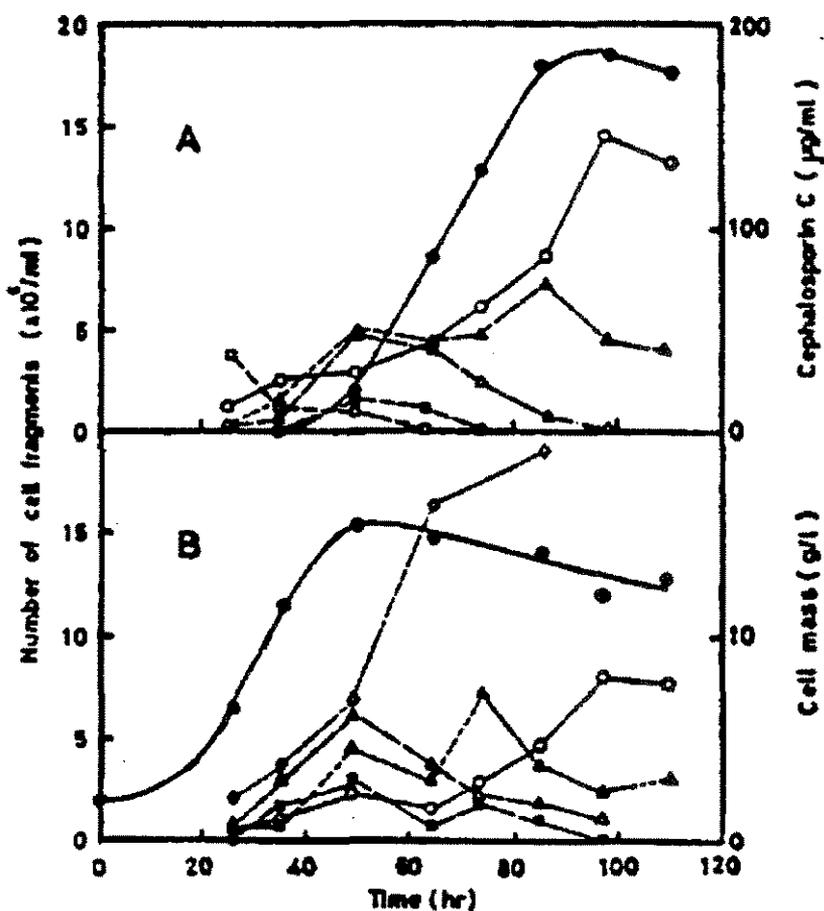


Figura 3.11: Células de *C. acremonium* M8650 em suas várias diferenciações morfológicas. (A), número de hifas, fragmentos de hifas altamente inchados, artrosporos unicelulares esféricos e artrosporos unicelulares elipsoidais e cefalosporina C. (B), fragmentos de hifas moderadamente inchados, artrosporos elipsoidais, conídios e massa celular. (□) hifas; (■) maior que 50 µm; (△) entre 25 a 50 µm; (▲) 25 µm e menor; (○) artrosporos unicelulares; (◇) conidia; (●) cefalosporina C em A, ou massa celular em B. (Matsumura *et al.*, 1980a)

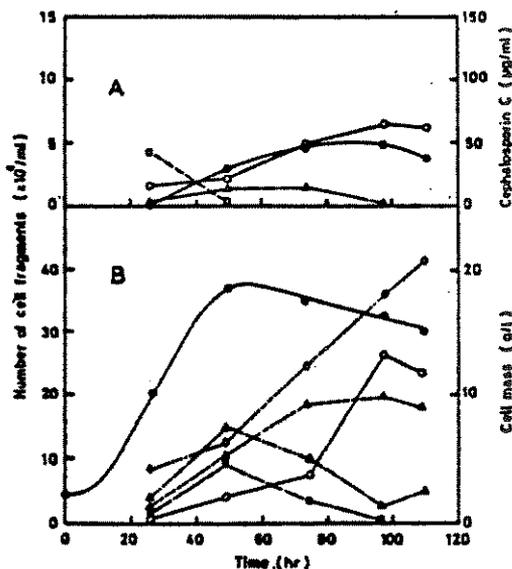


Figura 3.12: Células de *C. acremonium* M8650 em meio sem metionina. (□) hifas; (■) maior que 50 μm ; (Δ) entre 25 a 50 μm ; (\blacktriangle) 25 μm e menor; (\circ) artrosporos unicelulares; (\diamond) conidia; (\bullet) cefalosporina C em A, ou massa celular em B. (Matsumura *et al.*, 1980a)

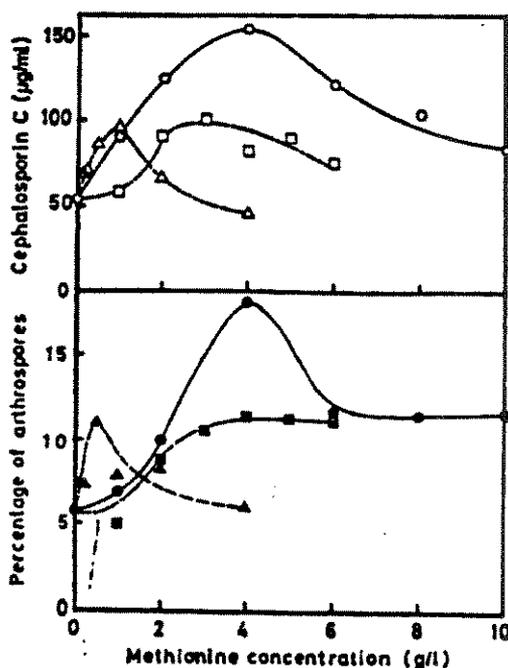


Figura 3.13: Síntese de cefalosporina C e formação dos artrosporos no *C. acremonium* M8650. O fungo cresceu em meios com várias

concentrações de metionina. Cultivo de 4 dias. (●, ○) DL-metionina; (▲, △), D-metionina; (■, □) L-metionina. (Matsumura *et al.*, 1980a)

Dennen e Carver (1969) estudaram a regulação da sulfatase e síntese de cefalosporina C, com *C. acremonium* Corda ATCC 11550 e vários mutantes M8650. Foram empregados cisteína e metionina como fonte de enxofre entre outros. A tabela 3.1 mostra que a atividade da sulfatase, em ordem crescente, foi superior para a cefalosporina C, taurina, metionina e homocisteína embora a potência do antibiótico atingido, em ordem decrescente, tenha sido metionina, tiosulfato de sódio, cisteína e sulfato de sódio. O estudo da influência da metionina como única fonte de enxofre é apresentado na figura 3.14. A figura 3.15 mostra a relação entre a atividade da sulfatase e síntese de antibiótico, com a idade da cultura. A figura 3.16 apresenta as capacidades dos vários mutantes que produziram o antibiótico. O gráfico sugere que o aumento do potencial genético produziu altos níveis de antibiótico a partir da metionina. A figura 3.17 mostra que a metionina e cisteína juntas no meio de cultura influenciaram positivamente na produção de cefalosporina C embora para a razoável obtenção do antibiótico, na faixa de 1300, a total ausência de metionina foi extremamente prejudicial. Ou seja a cisteína não substituiu a metionina. Baseados nos resultados obtidos os autores concluíram que o sistema de enzimas para sintetizar a cefalosporina e penicilina N já estão presentes, antes da transferência para o novo meio, portanto, nutrientes adequados no meio novo estimulam a formação do antibiótico por meio desse sistema enzimático já existente.

Tabela 3.1: Atividade da sulfatase e potência do antibiótico em cultura de *C. acremonium* com diferentes fontes de enxofre.

Additive	sulfatase activity, μ moles <i>p</i> -nitrophenol liberated per minute / mg cells	antibiotic potency, μ g/mL
Basal medium	3,52	20
Cephalosporin C	3,55	not measured
Taurine	3,33	320
DL-Methionine	2,45	1320
DL-Homocysteine	2,26	380
L-Cysteine	1,95	500
Sodium thiosulfate	1,86	1020
Sodium sulfite	1,58	510
Sodium sulfate	1,21	400

Obs: O micélio era transferido de meio contendo 0,02 M de sulfato e incubado por 7 dias. Fonte: Dennen e Carver, 1969.

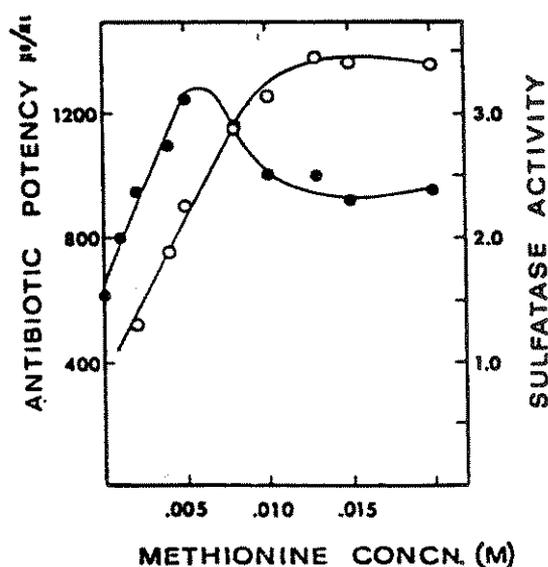


Figura 3.14: Relação entre produção de antibiótico e atividade de sulfatase como função da concentração de metionina no meio de cultura de *C. acremonium*. Potência do antibiótico (○); atividade da sulfatase, μ moles *p*-nitrophenol liberada por min/mg_{cél} (●). (Dennen e Carver, 1969)

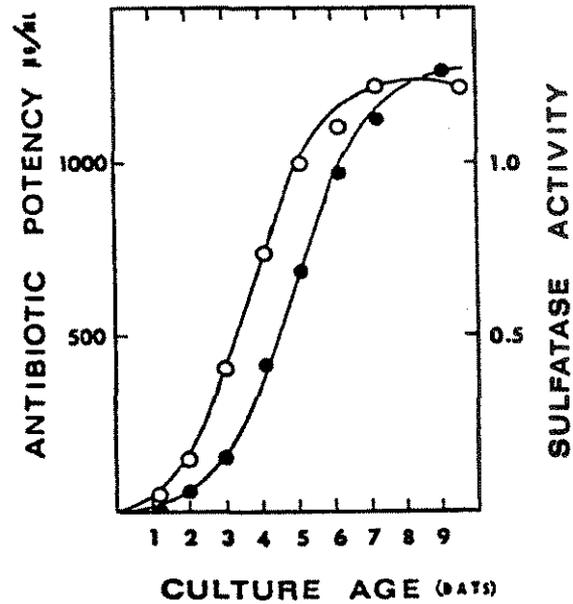


Figura 3.15: Relação entre síntese de antibiótico e atividade da sulfatase com a idade da cultura de *C. acremonium*. Potência do antibiótico (○); atividade da sulfatase, μ moles *p*-nitrophenol liberada por min/mL_{cel} (●). (Dennen e Carver, 1969)

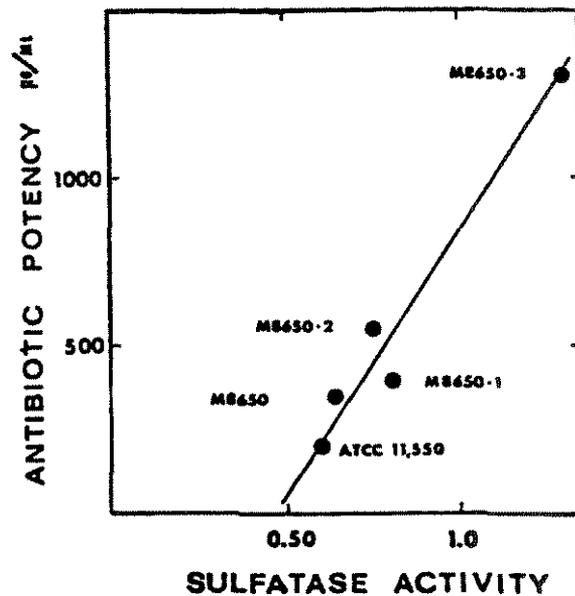


Figura 3.16: Atividade de sulfatase em linhagens de *C. acremonium*, de diferentes potenciais para produzir antibiótico. (Dennen e Carver, 1969)

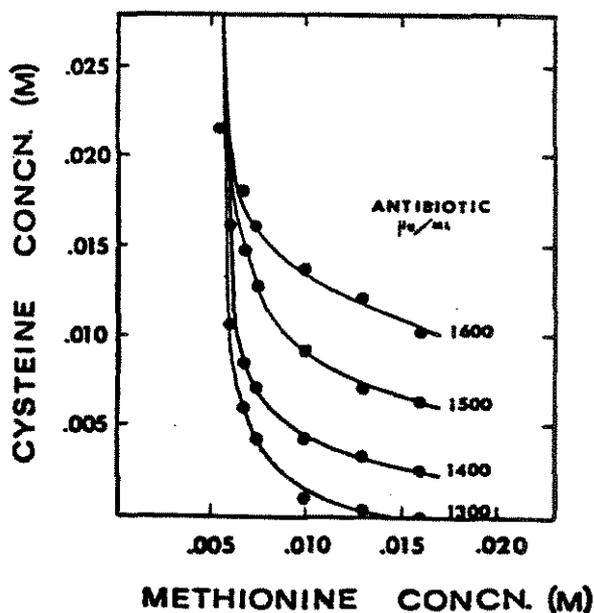


Figura 3.17: Influência da cisteína e metionina como fonte de enxofre na produção de antibiótico por *C. acremonium*. (Dennen e Carver, 1969)

Lemke e Nash (1972) e Nash e Huber (1971) empregaram algumas linhagens de *C. acremonium* para realizar mutações, com o objetivo de identificar as capacidades das linhagens modificadas para produzir cefalosporina C. A linhagem *C. acremonium* M 8650 - 1 - 3 foi a única que apresentou capacidade para sintetizar cefalosporina C; a linhagem ATCC 11550 apresentou apenas traços do antibiótico. Com a intenção de obter linhagens com capacidade de produzir cefalosporina C, Kitano *et al.* (1975) empregaram uma metodologia para a seleção da linhagem, partindo de cerca de 30 000 linhagens de fungos, actinomicetos e bactérias isoladas do solo, água do mar e esgoto. As tabelas 3.2 e 3.3 mostram os resultados obtidos.

Tabela 3.2: Resumo dos testes de isolamento de microrganismos

Microorganisms	No. of strains tested	No. of β -lactam antibiotic producer		
		Total	Type I*	Type II**
Fungi, isolated from soil	about 6×10^3	50	50	0
Fungi, type cultures	about 3×10^3	55	30	25
Yeast, type cultures	500	0	0	0
Bacteria, isolated from soil	about 1×10^4	0	0	0
Actinomycetes, type cultures	about 500	1	1	0
Actinomycetes, isolated from soil	about 1×10^4	35	35	0
Total	about 3×10^4	141	116	25

* Type I: Cephalosporins and penicillin N producer.

** Type II: Penicillin (G-type) producer.

Fonte: Kitano *et al.*, 1975.

Tabela 3.3: Classificação das linhagens de *C. acremonium* produtoras de antibióticos β -lactâmicos.

Color of colony	Alcuriospore	Size of conidia	Size of conidiophore	Width of mycelium	No. of strain	Corresponding species	Group
White to salmon pink	None or poor	$3 \times 3 \mu$	$15 \sim 30 \mu$	$2 \sim 3 \mu$	6	<i>C. purpurascens</i>	<i>C. acremonium</i> group
		3×3.5	$20 \sim 50$	$1.5 \sim 3$	3		
		2×5	$30 \sim 60$	$1 \sim 3$	11	<i>C. acremonium</i>	
		2×7	$30 \sim 60$	$1.5 \sim 2.5$	2		
		3.5×5	$25 \sim 35$	$2 \sim 3$	1	<i>Cephalosporium</i> sp.	
		4×8	$20 \sim 40$	$1.5 \sim 2.5$	1	<i>C. roseogriseum</i>	
White to yellow	Abundant	2×5	$25 \sim 60$	$1.5 \sim 3$	9	<i>C. polyanterum</i>	<i>C. chrysogenum</i> group
		2×5	$30 \sim 60$	$1.5 \sim 3$	2	<i>C. chrysogenum</i> .	
White to white	None	2×2.5	$25 \sim 30$	$1.5 \sim 2$	2	<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>C. cultipes</i> group
		1.5×3.5	$20 \sim 60$	$1 \sim 2$	3		

Fonte: Kitano *et al.*, 1975.

Shen *et al.* 1984, estudaram a influência de uma variedade de fontes de nitrogênio, na fermentação com o *C. acremonium* CW-19, para a produção de

cefalosporina C. Os resultados indicaram que a concentração de sulfato de amônio maior que 100 mM (ca. 1,3%) inibiu fortemente a produção de cefalosporina C, reduziu o crescimento celular e aumentou o pH do meio. As fontes de nitrogênio orgânico, L-asparagina e L-arginina, apresentaram melhores resultados para a obtenção de cefalosporina C. Os autores também verificaram que a amônia reprimiu a formação da “expandase” e não afetou a formação da “ciclase” significativamente. Porém altas concentrações de amônia impediram a formação de penicilina N, indicando algum efeito negativo sobre outra enzima anterior à “ciclase” e “expandase”.

Zhang *et al.* (1988) desenvolveram um sistema “cell free” para verificar a atividade da enzima δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine, ACV “sintetase”, que é a enzima fundamental para a formação de cefalosporina C. Os autores estudaram o efeito da amônia não só na formação da ACV “sintetase”, como também na formação da “expandase” e “ciclase”. Neste estudo os autores usaram linhagem *C. acremonium* C-10 e concluíram que a produção de cefalosporina C foi suprimida quando a fonte orgânica de nitrogênio (1,2% L-asparagina) foi substituída por igual quantidade de sulfato de amônia. Na condição de alta concentração deste composto inorgânico (3,5%) a produção foi muito prejudicada. A repressão pela amônia ocorreu sobre as formações de ACV “sintetase” e “expandase”, sendo que para a “ciclase” foi mais branda. Os autores observaram também a inibição da ACV “sintetase” pela amônia, isto é, 50% de inibição no meio contendo cerca de 1,7% de sulfato de amônia.

Kuenzi (1980) verificou que altos níveis de fósforo presentes na fermentação com *C. acremonium*, conduziu a um acúmulo de produtos secundários incompatíveis com a síntese da cefalosporina C, enquanto ocorria o consumo de glicose. O autor encontrou a concentração ótima de 85 mg/L de fósforo para a produção de cefalosporina C. Zhang *et al.* (1988) trabalharam com *C. acremonium* C-10 e verificaram a influência da repressão pelo fósforo. Os autores constataram que ACV “sintetase”, “ciclase” e “expandase” eram reprimidas e inibidas pelo fósforo. A enzima mais suscetível às duas espécies de regulação foi a “expandase”.

Sawada *et al.* (1980) estudaram a influência da concentração de sulfato de ferro na etapa de ciclização do δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-Cysteinil-D-Valine para isopenicilina N, examinando os extratos obtidos da linhagem *C. acremonium* M-0198 (NRRL 11418) não produtora de antibiótico em meio sintético, mutante *do C. acremonium* CW-19 (Demain *et al.*, 1963). Os estudos mostraram que a presença de sulfato de ferro na concentração ótima de 80 μ M dobrou a produção de isopenicilina N. Efeitos adicionais de outros íons Mn^{+2} , Cu^{2+} , Zn^{2+} foram pesquisados e não apresentaram resultados positivos. As figuras 3.18 e 3.19 apresentam o efeito do $FeSO_4$, e a atividade da enzima para a ciclização da isopenicilina N.

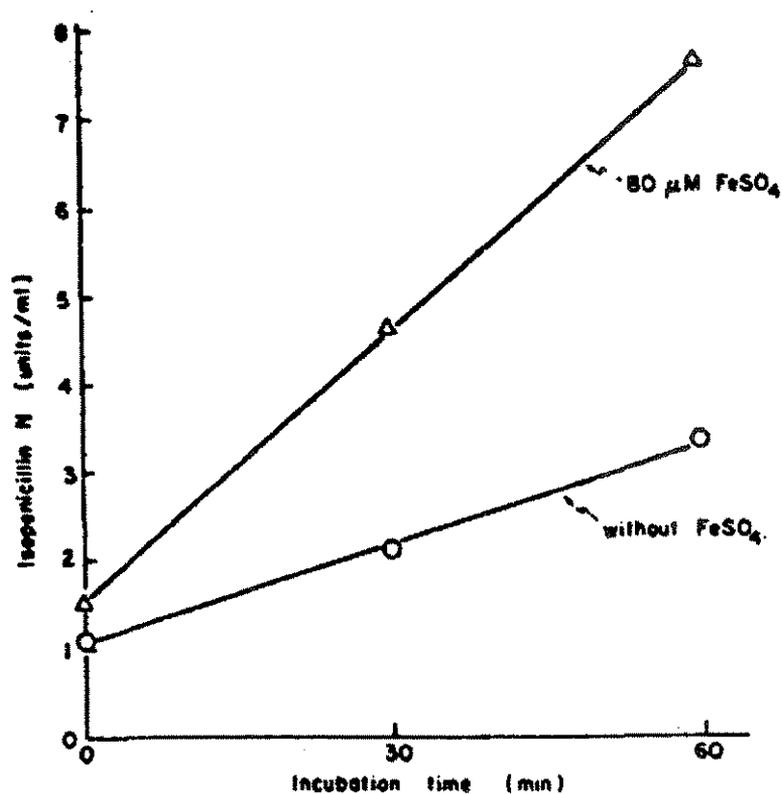


Figura 3.18: Conversão do dímero do LLD-tripeptídeo a isopenicilina N e sua estimulação pelo $FeSO_4$. (Sawada *et al.*, 1980)

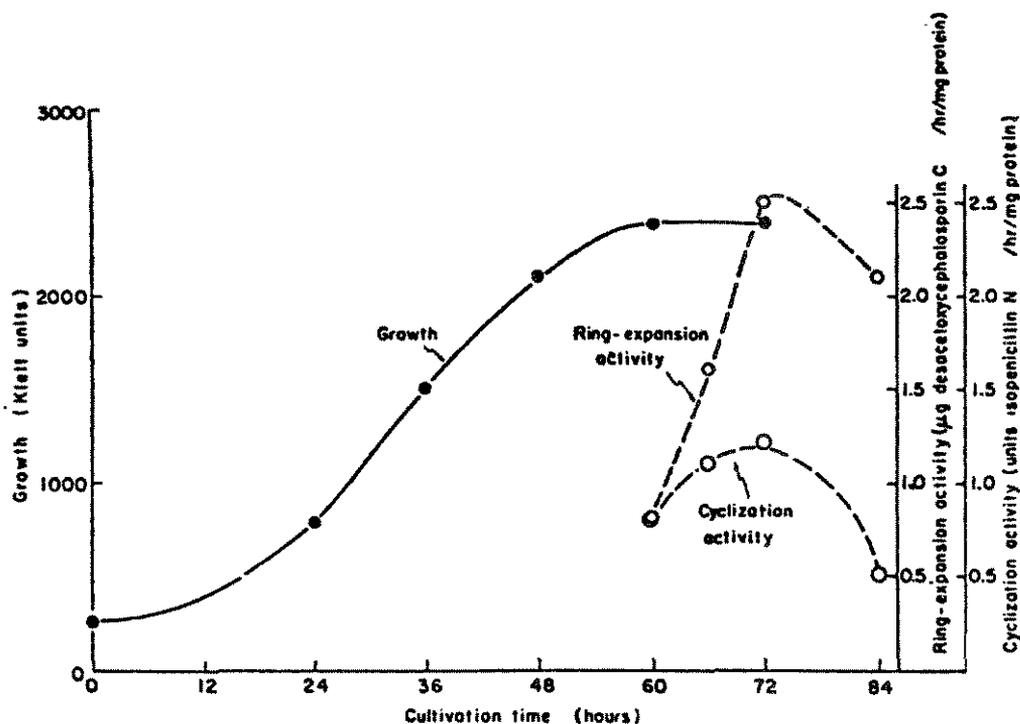


Figura 3.19: Produção de enzima para ciclização pelo *C. acremonium* M-0198. (Sawada *et al.*, 1980)

Behmer e Demain (1983) fizeram estudo comparativo com linhagens de *C. acremonium* CW-19 (produtora) e M-0198 (NRRL 11418) não produtora, sobre a regulação catabólica pela fonte de carbono. Os resultados comprovaram a regulação catabólica pela fonte de carbono, isto é, concentração alta de glicose reprimiu a enzima deacetoxycephalosporin C “sintetase”, “expandase”, reprimiu moderadamente a formação da “ciclase”, e inibiu a produção de penicilina N. Na condição de meio controle em que a razão glicose/sacarose empregadas eram 27:36 a produção de penicilina N foi pouco afetada. Na condição de baixa concentração de glicose, a produção de cefalosporina C foi suprimida e a síntese de penicilina N foi estimulada. Os autores concluíram que concentração de glicose e glicerol reprimiram a “expandase” coincidindo com os resultados obtidos por Demain e Kennel (1978). Estes resultados são mostrados na figura 3.20.

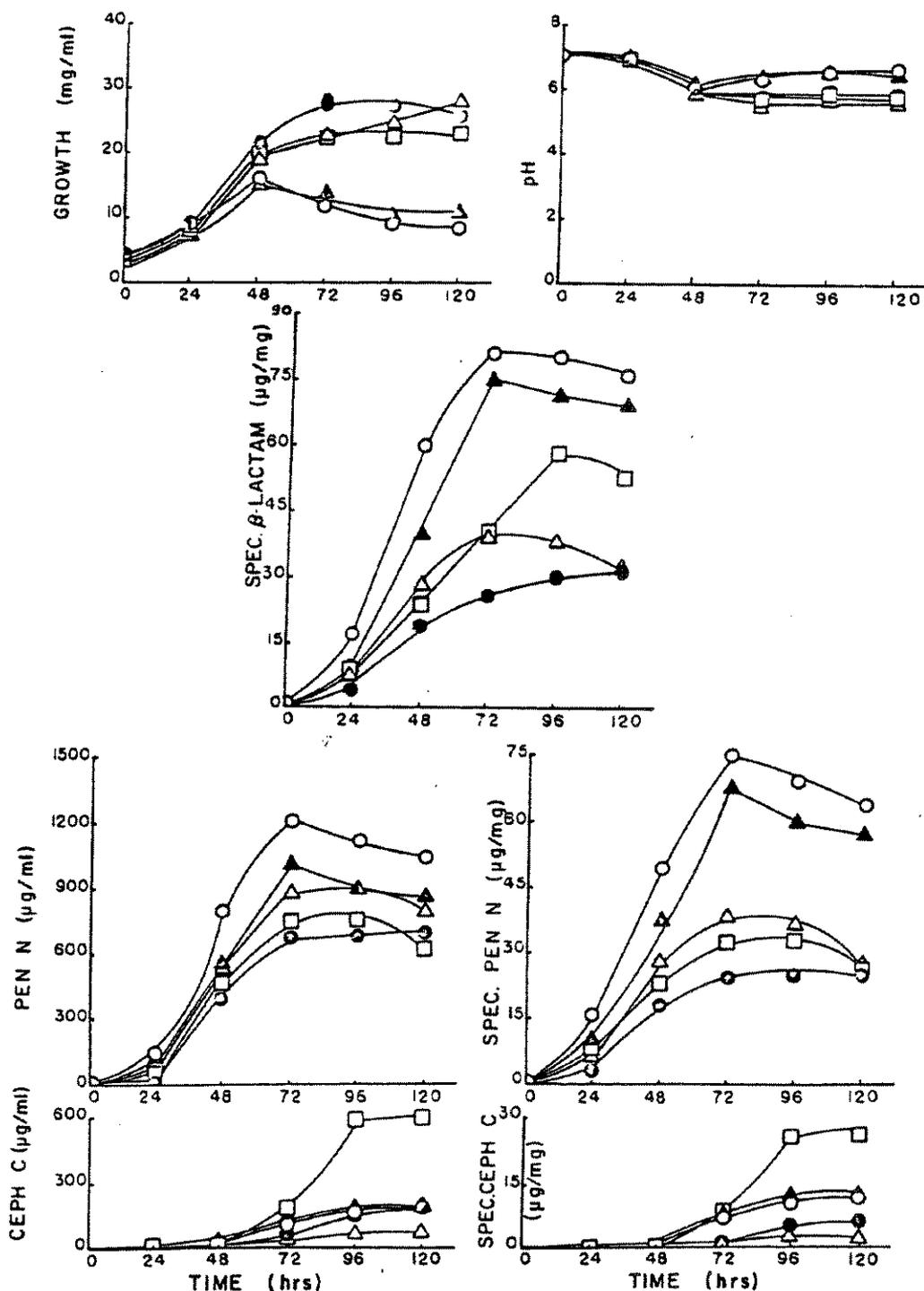


Figura 3.20: Efeito das concentrações de glicerol e glicose no crescimento de *C. acremonium* CW-19 e produção específica de antibiótico. (□) meio de controle glicose/sacarose 27:36; (▲) glicose (2,1%); (○) glicerol (2,1%); (●) glicose (6,3%); (△) glicerol (6,3%). (Behmer e Demain, 1983).

Shen *et al.* (1986) estudaram os efeitos da fonte de carbono e nitrogênio nas enzimas “ciclase” e “expandase” responsáveis pela etapa biossintética de cefalosporina C. Os experimentos foram conduzidos com duas linhagens de *C. acremonium*, sendo uma delas mais produtora, a linhagem C-10. Os autores postularam que, linhagens mais produtoras apresentaram níveis superiores das enzimas mencionadas e que aparentemente a deacetoxycephalosporina C “sintetase”, “expandase”, produzida era menos sensível à repressão pela fonte de carbono, e que a enzima chave para regulação metabólica seria a “expandase” que catalisa a expansão do anel da penicilina N. Esta enzima parece ser sítio de repressão pelas fontes de carbono e nitrogênio. Os resultados mostraram que a linhagem C-10 apresentou maior produção de cefalosporina C, maior velocidade de crescimento celular e ocorreu crescimento celular na presença de sacarose, após a exaustão da glicose. Para a outra linhagem, CW-19, o tempo de esgotamento dos açúcares foi superior. Shen, *et al.* (1986), de estudos anteriores, esperavam que a “ciclase” estivesse presente na fase de crescimento de ambas as linhagens, e a “expandase” aparecesse na linhagem CW-19 somente após a maioria dos açúcares presentes terem sido esgotados. Os resultados mostraram que a “expandase” já estava presente durante a fase de crescimento celular da linhagem C-10, e que a síntese da “expandase” iniciou mesmo na presença de glicose mostrando menor sensibilidade à repressão pela glicose do que a linhagem CW-19. A figura 3.21 apresenta os resultados obtidos por Shen *et al.* (1986).

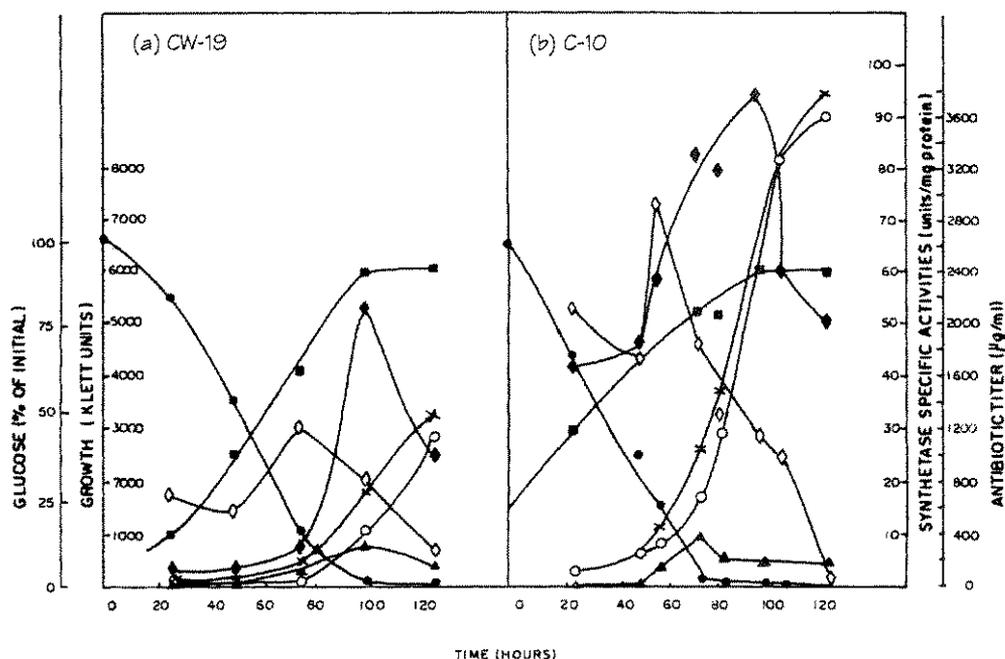


Figura 3.21: Formação das enzimas ciclase e expandase em fermentação com meio sintético. a) *C. acremonium* CW-19; b) *C. acremonium* C-10. (▲) penicilina N; (●) glicose; (◇) expandase; (○) cefalosporina; (■) crescimento; (◆) ciclase; (x) antibióticos totais. (Shen *et al.*, 1986)

Demain e Kennel (1978) por meio de estudos com sistema “resting cell” investigaram sobre que tipo de regulação ocorria pela fonte de carbono na produção de antibiótico usando linhagem *C. acremonium* CW-19. Foram empregados glicose, frutose, maltose, galactose e sacarose como fontes de carbono. Os resultados indicaram que as fontes de carbono reprimiram e inibiram a formação das enzimas biossintetizantes de cefalosporina C, como pode ser observado na figura 3.22. A influência da concentração da glicose também foi examinada e está mostrada na figura 3.23. Com relação às diferentes fontes de carbono os autores constataram que os açúcares de fácil assimilação, são utilizados pelo fungo para a fase de crescimento celular e a sacarose, de lenta assimilação, é utilizada para a fase de formação do antibiótico. Demain e Kennel (1978) explicaram que durante o metabolismo da glicose são produzidos ácidos que reduzem o pH do meio a valores que inibem e inativam a ação da enzima “sintetase” e por isso só após o esgotamento da glicose é que ocorre o surgimento do antibiótico. Esses autores definiram o sistema “resting

cell" empregado e justificaram que a citada técnica de trabalho tinha como objetivo avaliar a atividade das células colhidas em diferentes tempos de fermentação; para detectar a formação das enzimas responsáveis pela produção de antibiótico e a qualidade ou quantidade da fonte de carbono presente durante a fermentação.

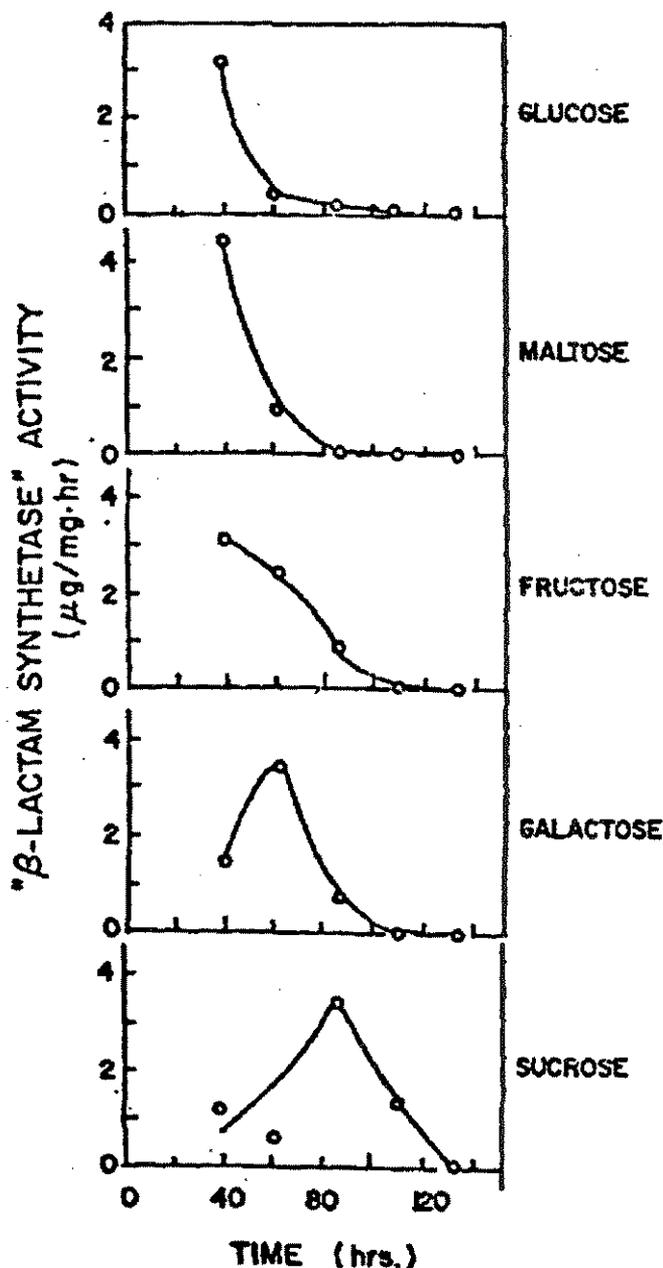


Figura 3.22: Atividade da enzima para a síntese β-lactâmica de *C. acremonium* em função do tempo, em meios com diferentes açúcares. (Demain e Kennel, 1978)

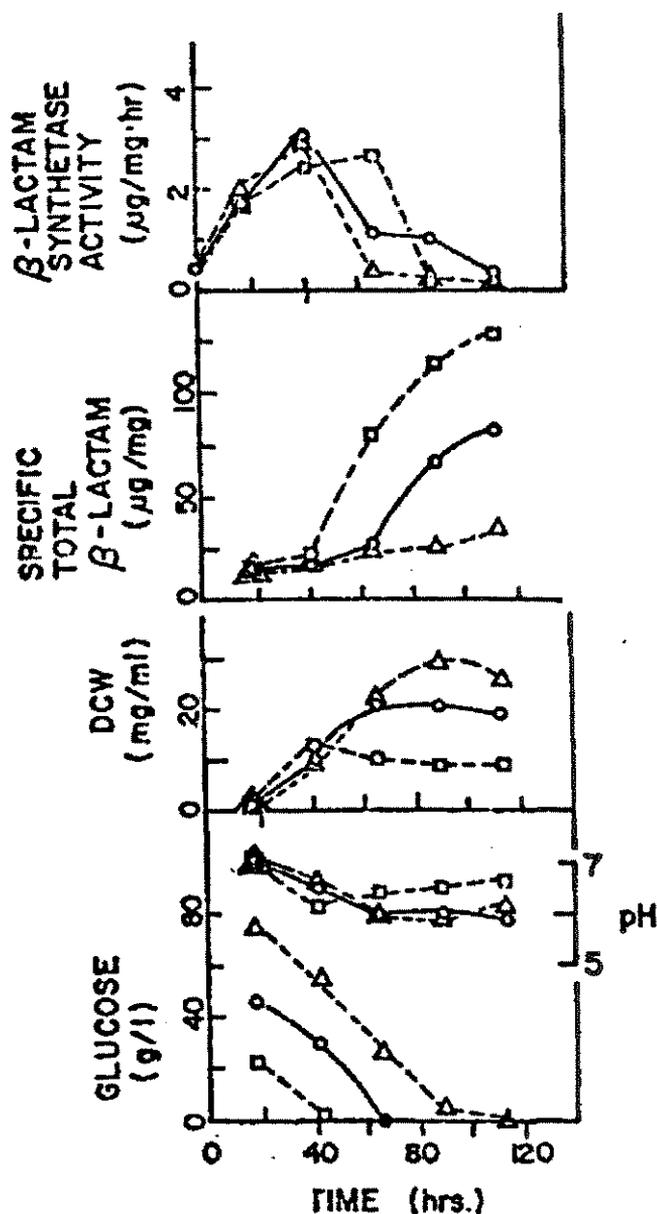


Figura 3.23: Crescimento, formação de antibiótico e atividade da sintetase do *C. acremonium* contendo diferentes concentrações de glicose. (\square) concentração baixa de glicose (\circ) concentração intermediária de glicose (\triangle) concentração alta de glicose (Demain e Kennel, 1978).

3.2.3. Diferenciação morfológica

Os fungos, em geral, apresentam no seu ciclo de vida alterações morfológicas. Para o caso dos bioprocessos com *C. acremonium*, visando a obtenção de cefalosporina C, alguns autores no desenvolvimento de seus trabalhos têm buscado

alguma relação entre a produção de antibiótico, a viscosidade aparente do caldo e uma determinada morfologia celular. A figura 3.24 apresenta um diagrama esquemático da diferenciação morfológica relacionada com a produção do antibiótico.

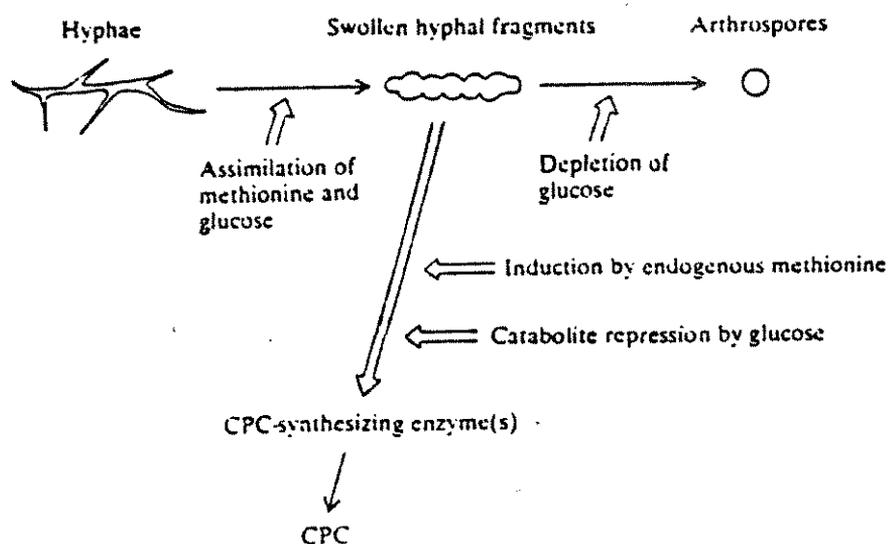


Figura 3.24: Diagrama esquemático da morfologia fúngica e suas transições para a produção de cefalosporina C pelo *C. acremonium* (Matsumura, 1981).

Nash e Huber (1971) realizaram fermentações submersas com *C. acremonium* Corda M8650 e a linhagem ATCC11550 para investigar alguma relação entre a diferenciação morfológica do fungo e a produção de antibiótico. Os autores classificaram a diferenciação celular como filamentos de hifas, hifas fragmentadas e inchadas, artrosporos e conídios. Foi observado pelos autores que apesar da fase de diferenciação em artrosporos, coincidir com a fase de velocidade máxima de síntese de antibiótico β -lactâmico, existem mutantes não produtores de antibiótico, que também sofrem diferenciação morfológica. A síntese de antibiótico e diferenciação celular não estão obrigatoriamente relacionadas.

Matsumura *et al.* (1980a) empregaram *C. acremonium* M8650 e CW-19 para a fermentação em sistemas “resting-cell” e classificaram as alterações morfológicas do

microrganismo em hifas, fragmentos muito intumescidos e septados de hifas, fragmentos moderadamente inchados e septados de hifas, artrosporos unicelulares e conídios. Esses autores tentaram associar a distribuição das formas citadas com a produção de cefalosporina C por meio de estágios de fermentação em meio sintético contendo 0,5% de DL-metionina. Foi evidenciado que as hifas delgadas com ramificações, estavam presentes no início do processo. Na fase de crescimento as hifas incharam e apresentaram septo seguido por fragmentação, e uma pequena quantidade de cefalosporina C foi produzida. Após a depleção de glicose, por volta de 50 h de cultivo, ocorreu fragmentação extensiva de hifas longas e inchadas para curtas e inchadas. Com a diminuição das populações das hifas moderadamente longas e altamente inchadas e fragmentadas, o número de artrosporos unicelulares esféricos e elipsoidais aumentou, indicando que fragmentos longos de hifas se tornaram mais curtos e passaram à forma de artrosporos unicelulares. O esgotamento da glicose coincidiu com o aparecimento de cefalosporina C e a fragmentação do micélio em fragmentos altamente inchados em artrosporos unicelulares. O término da produção de cefalosporina C ocorreu juntamente com o desaparecimento completo das hifas longas e inchadas. Os autores sugeriram que os fragmentos de hifas altamente inchados poderiam ser a forma primariamente responsável para a síntese de antibiótico, embora a formação de conídios estivesse aparentemente correlacionada à biossíntese de cefalosporina C. Essa questão foi examinada nas fermentações variando-se as concentrações de metionina no meio. A metionina melhorou não só a produção de antibiótico mas também a diferenciação da hifa em fragmentos altamente inchados como mostrado anteriormente nas figuras 3.11, 3.12 e 3.13.

Essas observações coincidiram com os resultados obtidos por Queener e Ellis (1975 *apud* Matsumura *et al.*, 1981), os quais indicaram que as hifas longas e altamente inchadas podem possuir grande atividade para produzir cefalosporina C, pois ainda que uma grande quantidade de hifas altamente inchadas e longas fragmentadas aparecessem na fase de crescimento, somente uma pequena quantidade de cefalosporina C era produzida devido à repressão catabólica pela glicose. Os autores concluíram que a cefalosporina C é sintetizada pela ocorrência de um

conjunto de eventos que está relacionado com o processo de diferenciação em artrosporos.

Kim e Yoo (1992) consideraram as alterações morfológicas do *C. acremonium* num bioprocesso em três tipos morfológicos principais: filamentos de hifas, hifas longas inchadas e hifas curtas inchadas (contendo artrosporos), para quantificar a contribuição de cada tipo de célula na reologia do caldo. Os autores desenvolveram um procedimento para realizar a separação dos tipos morfológicos por meio de filtração, e concluíram que as hifas filamentosas longas e inchadas eram as responsáveis pelo aumento da viscosidade do caldo.

3.3. Reologia

Os processos fermentativos são aqueles caracterizados pelo cultivo de um microrganismo em condições tais, que permitam a obtenção do produto de interesse como resultado do seu metabolismo, realizados em biorreatores heterogêneos. Durante as fermentações o consumo dos nutrientes presentes no meio pelos microrganismos é convertido em biomassa. A biomassa pode apresentar formas diferentes em função do microrganismo utilizado, por exemplo as células das leveduras e bactérias são pequenas e uniformes, enquanto as células de fungos apresentam uma variação na sua morfologia ao longo do seu ciclo vegetativo, que varia inclusive de uma linhagem para outra, partindo de hifas filamentosas chegando a formas arredondadas. Essas variações que ocorrem no biorreator desencadeiam a necessidade da compreensão do comportamento do escoamento dos caldos de fermentação (Metz *et al.*, 1979; Reuss *et al.*, 1982; Charles, 1978; Allen e Robinson, 1987; Badino Jr., 1991; Bird *et al.*, 1964).

A ciência que estuda a deformação e as propriedades de escoamento da matéria chama-se Reologia. Do ponto de vista da reologia, os fluidos podem ser classificados como fluidos Newtonianos e não-Newtonianos. Os fluidos Newtonianos são aqueles que obedecem à proporcionalidade direta entre a tensão de cisalhamento e

a taxa de deformação descrita pela lei de Newton. Os fluidos não-Newtonianos são todos aqueles que não obedecem a lei de Newton, como pode ser visto na figura 3.25.

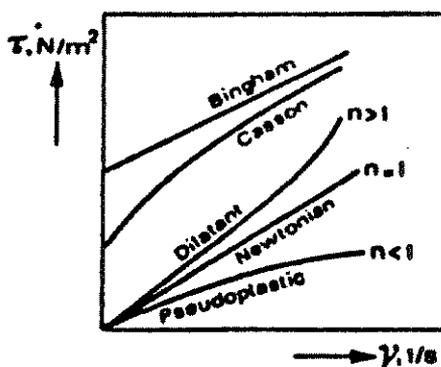


Figura 3.25: Modelos reológicos. (Metz *et al.*, 1979b)

Os caldos de fermentações fúngicas geralmente, possuem características de fluidos não-Newtonianos. Isto significa que para cada taxa de deformação existe um valor de viscosidade aparente. Esse fato influencia diretamente o curso de uma fermentação, na medida em que nesse processo acontecem simultaneamente, transportes de massa e calor tais: como a migração dos nutrientes (alguns insolúveis no meio) do caldo até a célula, a dissolução de oxigênio gasoso no meio fermentativo, a migração do oxigênio dissolvido até a célula, a migração dos metabólitos produzidos da célula para o meio e a necessidade da manutenção da homogeneidade dentro do biorreator para garantir mistura completa, e uniformidade de temperatura e de pH. Portanto, a variação da viscosidade num processo fermentativo provoca alterações nos transportes de massa e calor ocasionando prejuízo no desempenho do biorreator (Taguchi, 1971 *apud* Badino, 1991; Suijdam e Metz, 1981).

A caracterização reológica dos caldos permite quantificar a viscosidade ao longo do bioprocessamento para o cálculo da potência exigida para a agitação e para controle das condições de aeração e mistura dentro do biorreator, evitando a queda do rendimento do processo. Metzner *et al.* (1961) desenvolveram um estudo sobre agitação de fluidos viscosos Newtonianos e não-Newtonianos, para desenvolver

análises quantitativas mais fáceis de exigências de potência em agitação de fluidos não-Newtonianos e para obter informações qualitativas sobre as velocidades de mistura nesses sistemas. As exigências de potência para a agitação de fluidos Newtonianos foram estendidos a sistemas empregando duas turbinas e com baixa relação T/D (diâmetro do tanque/diâmetro da turbina). Como postulado anteriormente, foi confirmada a proporcionalidade direta entre a taxa de deformação e a velocidade da turbina, independente de todas as outras variáveis. Para fluidos viscosos e com índices de comportamento de escoamento (n) inferiores à unidade (pseudoplásticos e Binghamianos), o uso de turbinas de pás planas, ventoinhas e hélices, cujo valor universal para os três impulsores foi de 11.

A literatura relata que o controle do processo fermentativo com caldos não-Newtonianos e a ampliação de escala são dificultadas pela carência de estudos enfocando os seguintes itens: comportamento reológico, equações constitutivas, modelo de Casson, modelo da lei da potência, comportamento Newtoniano, comportamento não-Newtoniano, efeito da morfologia na reologia do caldo, efeito da idade da fermentação na reologia, etc., além da falta de um detalhado entendimento da transferência de oxigênio, dos efeitos de mistura e das exigências de potência para a agitação (Blanch e Bhavaraju, 1976, Charles, 1978, Metzner e Otto, 1957 *apud* Charles, 1978, Metzner e Taylor, 1960 *apud* Charles, 1978, Olsvik e Kristiansen, 1994, 1992a, 1992b, Olsvik *et al.* 1993).

As propriedades reológicas dos fluidos das culturas exercem um grande efeito sobre o curso das fermentações, sobre a resposta e a confiança dos sensores, e sobre a dificuldade nos processos de recuperação. Além disso, as propriedades reológicas podem indicar o estado da fermentação e podem ser usadas para o controle e monitoração do processo. Um amplo estudo abrangendo propriedades de medição reológica e avaliações críticas das propriedades reológicas de fluidos de cultura e dos seus efeitos no processo, foi realizado por Charles (1978).

Reuss *et al* (1982) apresentaram um estudo onde são enfocados problemas típicos de reologia em biotecnologia: viscosidade das suspensões de leveduras, processos de transporte em caldos de cultura micelial e polissacarídeos representando

processos em que o aumento da viscosidade é principalmente controlado por um produto microbiano extracelular. A medida de taxa de cisalhamento em função da taxa de deformação no viscosímetro rotacional, forneceram o limite superior da viscosidade Newtoniana. O comportamento reológico sugeriu plástico de Bingham.

Goto *et al.* (1986, *apud* Kim e Yoo, 1992) desenvolveram um estudo com concentrados de suspensões de fibras (vidro, nylon, vinylon, carbono, em glicerina, hidroximetilcelulose e soluções de separação) para comparar com a morfologia do microrganismo, e verificar a influência das características reológicas à baixa taxa de deformação. Os autores concluíram que suspensões de fibras em fluidos Newtonianos mostraram comportamento não-Newtoniano em baixas taxas de deformação e viscosidade Newtoniana a maiores taxas de deformação. Além disso, eles encontraram que a influência da concentração de fibra e parâmetros morfológicos tal como comprimento partícula/diâmetro e flexibilidade eram fortes em baixas taxas de deformação e de menor importância com o aumento da taxa de deformação.

Allen e Robinson (1990) estudaram as propriedades reológicas dos caldos de cultivo de *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Streptomyces levoris* em substratos solúveis. Foram empregados três tipos de viscosímetros: “pipeline”, cilindros concêntricos (Haake modelo RV12, MV2 e MV3) e de helicóide de fita. Os autores concluíram que: 1) os efeitos de deslizamento na parede foram mais significantes nos viscosímetros “pipeline”; 2) os resultados foram confiáveis e compatíveis nas medições feitas com viscosímetro “pipeline” de maior diâmetro, com impulsor helicóide de fita e com viscosímetro de cilindros concêntricos. O efeito do deslizamento das células não foi significativo para estes sistemas citados; 3) não houve problema de sedimentação da biomassa com os viscosímetros de cilindros concêntricos e “pipeline”; 4) quanto à seleção do viscosímetro, os autores verificaram que os viscosímetros de cilindros concêntricos ou “pipeline” cobriram o intervalo de taxa de cisalhamento esperado no processo; 5) a concentração de biomassa e morfologia do organismo tiveram um papel importante na determinação do comportamento em baixas deformações, mas diminuíram de importância com o aumento da taxa de deformação.

Berovic *et al.* (1991) estudaram um grande número de fermentações submersas de ácido cítrico em substratos com melaço de beterraba empregando *Aspergillus niger*. As características reológicas foram medidas com viscosímetro Rheotest 3 em configuração de cilindros duplos. A taxa de cisalhamento, τ , do caldo de fermentação foi caracterizada pelo modelo da lei da potência de Ostwald-de Waele (Blanch e Bhavaraju, 1976). Os resultados obtidos confirmaram que os caldos de fermentação submersa cítrica mostram comportamento reológico não-Newtoniano pseudoplásticos. Isso foi bem demonstrado durante o período de variação no crescimento micelial dos aglomerados de hifas para pellets miceliais esféricos, que representam a forma produtiva do fungo. A variação mais significativa nas propriedades reológicas ocorreu durante o período de produção máxima de ácido cítrico, no tempo de aumento exponencial em biomassa. Os autores comentaram que o crescimento na forma de “pellets” simboliza resistência à taxa de cisalhamento no sistema, causando reologia pseudoplástica e reduzindo significativamente a transferência volumétrica de oxigênio e pressão parcial de oxigênio.

Kim e Yoo (1992) e Gomes *et al.* (1996a, 1996b, 1997a e 1997b) estudaram as propriedades reológicas dos caldos de fermentações fúngicas empregando *Cephalosporium acremonium*, usando o viscosímetro Brookfield de cilindros coaxiais modelo LVT.

Kim e Yoo (1992) obtiveram uma correlação do índice de consistência correspondente às concentrações de células para cada tipo morfológico, empregando o modelo da lei da potência. Os resultados indicaram que além da concentração de células, outros fatores como morfologia (tamanho, frequência de ramificações, flexibilidade) concentração de metabólito extracelular e temperatura interferiram nos parâmetros reológicos. Os autores estabeleceram que a diferenciação morfológica do *C. acremonium* consistia de três tipos: filamentos de hifas, hifas longas e inchadas e hifas curtas e inchadas, estas últimas contendo artrosporos. As propriedades reológicas foram medidas para cada tipo morfológico, após a separação. Foi observado que a suspensão de caldos com hifas filamentosas e hifas longas inchadas apresentaram comportamento pseudoplástico, enquanto a suspensão de hifas curtas e

inchadas apresentaram comportamento Newtoniano. As suspensões com hifas curtas e inchadas comparadas com as de hifas longas mostraram viscosidade aparente inferior. Os autores concluíram que o tipo morfológico de célula influencia as propriedades reológicas do caldo como pode ser visto na tabela 3.4 e figuras 3.26 a 3.29.

Tabela 3.4: Tipos morfológicos do *C. acremonium*. Fermentação em tanque agitado.

Morphology type	cell dia. (μm)	cell length (μm)	septum
filamentous hyphae (X_F)	1 - 3	-	no
long swollen hyphae (X_{LS})	4 - 6	above 50	yes
short swollen hyphae (X_{SS})	4 - 6	below 50	yes / unicell

Fonte: Kim e Yoo, 1992.

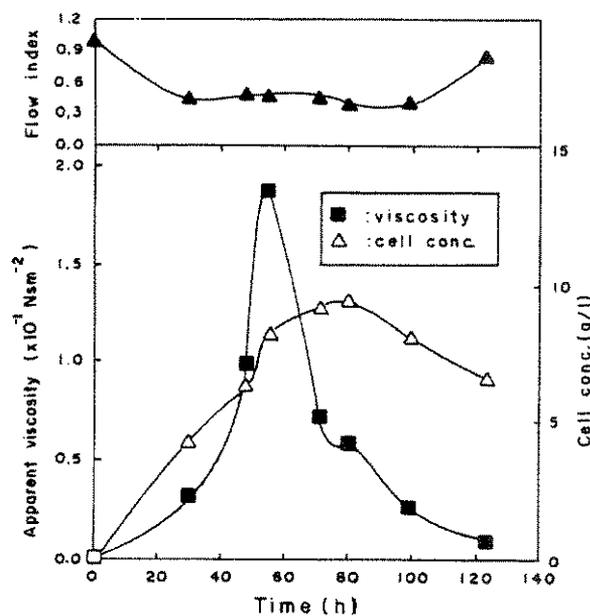


Figura 3.26: Características reológicas do caldo de fermentação em biorreator tipo tanque. Viscosidade aparente, índice de escoamento e concentração de células em função do tempo. (Kim e Yoo, 1992).

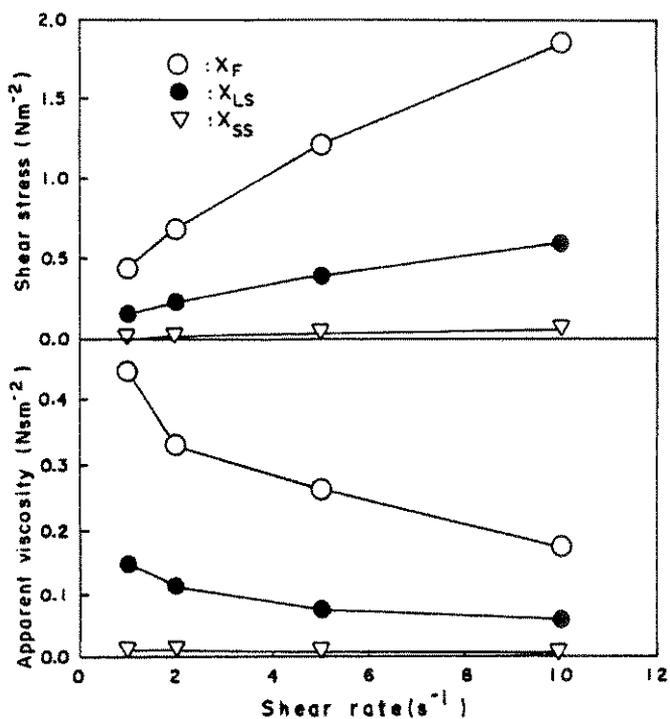


Figura 3.27: Reograma para cada tipo morfológico celular. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. Taxa de cisalhamento e viscosidade aparente em função da taxa de deformação. (Kim e Yoo, 1992).

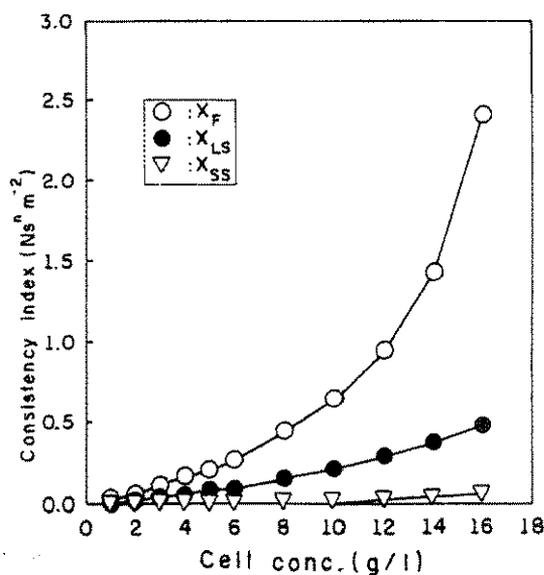


Figura 3.28: Índices de consistência para cada tipo morfológico em função da concentração de células. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. (Kim e Yoo, 1992)

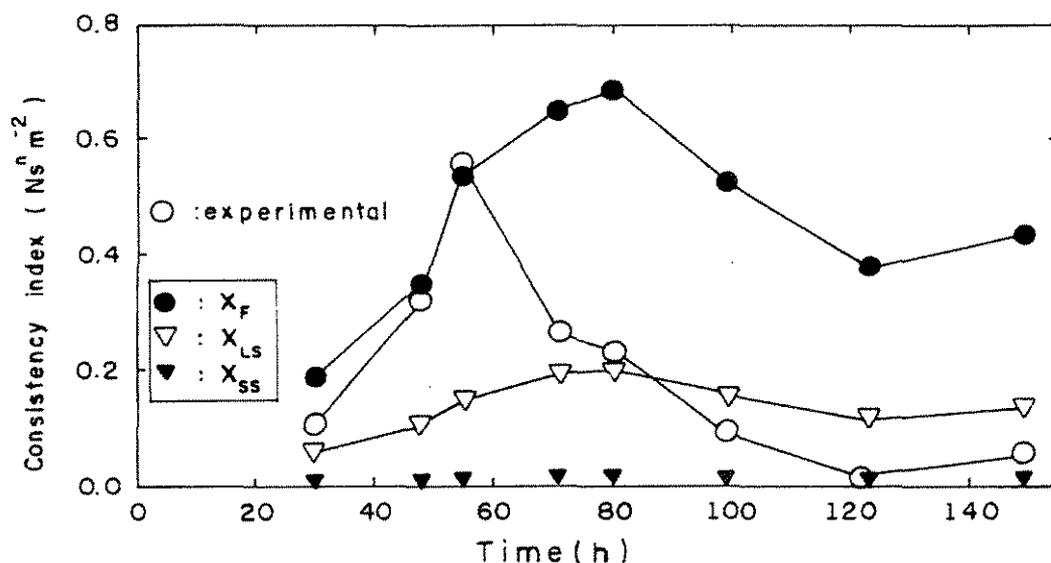


Figura 3.29: Comparação dos índices de consistência de cada tipo morfológico com o índice de consistência do caldo fermentativo. (X_F) filamentos de hifas; (X_{LS}) hifas longas e inchadas; (X_{SS}) hifas curtas e inchadas. (Kim e Yoo, 1992)

Gravrilescu *et al.* (1992) estudaram a reologia dos caldos de fermentações submersas aeróbias utilizando actinomicetos e fungos em tanques agitados com impulsores tipo turbinas. Os resultados obtidos apresentaram caldos com comportamento não-Newtoniano segundo o modelo da lei da potência com o índice de correlação de aproximadamente 0,95. Foi observado que os líquidos estudados eram pseudoplásticos e que o índice de consistência (K), o índice de escoamento (n), a viscosidade aparente (μ_{ap}), a viscosidade máxima Newtoniana (μ_0) eram função da idade da cultura, linhagem e das condições da batelada. Os autores mencionam a importância da observação cuidadosa da dinâmica do comportamento reológico para evitar limitação de oxigênio.

Gomes *et al.* (1996a, 1996b, 1997a e 1997b) estudaram as propriedades reológicas dos caldos de fermentação em biorreator de tanque agitado operando em batelada e em batelada alimentada empregando *C. acremonium* C-10 em meio sintético. Os autores usaram o viscosímetro Brookfield de cilindros concêntricos.

Com o modelo da lei da potência, os autores concluíram que nas 120 horas de fermentação o caldo apresentou características de fluido Newtoniano e pseudoplástico para tempos distintos. Resultado semelhante foi observado por Queiroz *et al.* (1997), quando trabalhou com *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

3.3.1. Fluidos Newtonianos e escoamento laminar

O movimento da turbina de um agitador em contato com um fluido produz o seu escoamento segundo um modelo característico, resultando no desenvolvimento de forças internas, e na aplicação sobre o impulsor de forças características que devem ser continuamente contrabalançadas (i.é. por um motor) para manter o fluido em movimento. A natureza do modelo de escoamento e a grandeza das forças internas e forças aplicadas dependem primariamente da geometria do sistema, da velocidade de movimentação do fluido e das suas propriedades reológicas intrínsecas.

Charles (1978) apresenta um exemplo que ilustra este fenômeno que pode ser visto na figura 3.30. O líquido encontra-se confinado entre dois cilindros coaxiais cujos raios têm tamanho suficiente para que a curvatura seja desprezível e não exerça nenhuma influência. Com essa suposição as superfícies dos dois cilindros passam a ser considerados como placas planas e paralelas. Ao girar o cilindro interno o fluido adjacente à superfície externa do cilindro será deslocado e para manter estacionário o cilindro externo um torque terá que ser aplicado ao mesmo. Sendo assim o fluido exerce uma força tangencial no cilindro externo, enquanto o cilindro interno exerce uma força sobre o fluido em contato com ele, e essa força é transmitida através do fluido de uma camada para a outra. Em qualquer ponto no fluido, a força tangencial dividida pela área da superfície que age sobre ela é definida como taxa de cisalhamento (τ).

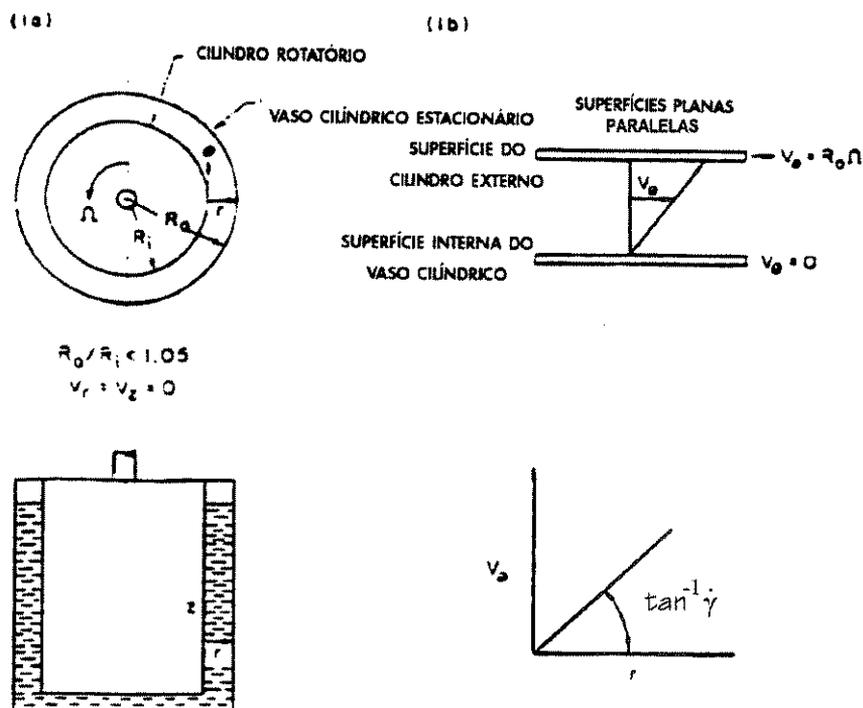


Figura 3.30: (a) Escoamento laminar entre cilindros concêntricos de curvatura desprezível. (b) Perfil de velocidade. (adaptado de Charles, 1978)

A experiência mostra que, para um dado fluido a taxa de cisalhamento varia com a taxa de movimento do fluido, a qual é determinada em parte pela velocidade do cilindro. Além do mais, se a velocidade de rotação não é muito alta a componente macroscópica da velocidade do fluido estará na direção do escoamento; e a componente da velocidade nas direções de r e θ será zero. Este tipo de movimento de fluido denomina-se de escoamento laminar.

A análise das equações fundamentais da fluidodinâmica revela que, para escoamento laminar do tipo ilustrado na figura 3.30, a taxa de cisalhamento será constante através do fluido e a velocidade de fluido variará linearmente de zero na superfície fixa até R_o na superfície girante.

Para descrever a natureza do campo de escoamento no escoamento laminar, define-se a taxa de deformação, $\dot{\gamma}$, como

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dn} \quad (3.1)$$

onde, n representa a direção perpendicular para a direção do movimento do fluido em um ponto e u é a velocidade do fluido. A taxa de deformação tem unidades expressa em s^{-1} . Para o caso considerado, tem-se que:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dx} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{u_i}{\Delta x} \quad (3.2)$$

onde, u_i é a velocidade do cilindro interno e Δx é a espessura da camada líquida. A equação 3.2 é válida somente quando a curvatura dos cilindros coaxiais não tem influência. Para muitos fluidos como água e soluções de açúcares, a relação entre taxa de cisalhamento e taxa de deformação para escoamento laminar é dada por:

$$\tau = -\eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.3)$$

onde, η é uma constante chamada de viscosidade cuja unidade é o centipoise (1g/cm.s). O sinal negativo é convenção. Fluidos que apresentam esse comportamento são chamados de fluidos Newtonianos.

Essas equações são válidas para os casos em que a curvatura dos cilindros coaxiais não interferem no escoamento.

A taxa de deformação para um fluido que escoar em uma superfície cilíndrica, cuja curvatura não pode ser desprezada, pode ser expressa da seguinte forma:

Velocidade do fluido Newtoniano em escoamento laminar, em tubo:

$$u_z = u_m \left[1 - \frac{r}{R} \right]^2 \quad (3.4)$$

onde u_z velocidade de fluido na posição radial r ; u_m velocidade máxima de fluido em $r=0$; e R = raio do tubo

A equação 3.4 é usada para calcular a taxa de deformação:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dn} = \frac{du_z}{dr} = -\frac{2u_m}{R} \left(\frac{r}{R} \right) \quad (3.5)$$

E a taxa de cisalhamento é então expressa pela equação 3.6.

$$\tau = -\eta \dot{\gamma} = \frac{2u_m}{R} \eta \left(\frac{r}{R} \right) \quad (3.6)$$

Ambas as taxas de deformação e de cisalhamento na parede do tubo são facilmente calculadas para fluidos Newtonianos, a partir de medidas da taxa de

escoamento e da queda de pressão. Portanto, o escoamento em capilar fornece uma medida conveniente para a determinação da viscosidade de fluidos Newtonianos em muitos casos.

Para cilindros coaxiais que não se aproximam de lâminas paralelas pode ser visto que para fluidos Newtonianos no escoamento laminar, a taxa de deformação é expressa pela equação 3.7.

$$\dot{\gamma} = -r \frac{d\omega}{dr} = -\frac{2\Omega}{r^2} \frac{R_i^2 R_0^2}{R_0^2 - R_i^2} \quad (3.7)$$

e a taxa de cisalhamento pela seguinte equação:

$$\tau = \frac{M}{2\pi r^2 h} \quad (3.8)$$

onde, ω é velocidade angular; Ω é a velocidade angular do cilindro interno, R_i é o raio do cilindro interno; R_0 é o raio do cilindro externo; M é o torque, e h é a altura do líquido.

O sistema coaxial, pode então ser usado em um simples ajuste para determinar a viscosidade do fluido Newtoniano, que é expresso pela equação 3.9.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{M_0}{4\pi h \Omega} \left(\frac{1}{R_0^2} - \frac{1}{R_i^2} \right) \quad (3.9)$$

3.3.2. Fluidos não-Newtonianos: pseudoplasticidade

Diversos fluidos, inclusive caldos fermentativos não exibem comportamento Newtoniano. As características mais comuns de fluidos não-Newtonianos é a pseudoplasticidade que pode ser visto na figura 3.31 (a e b). A relação entre a taxa de cisalhamento e a taxa de deformação em escoamento laminar bem definido é chamada de viscosidade aparente (η_a) e diminui com a elevação da taxa de deformação.

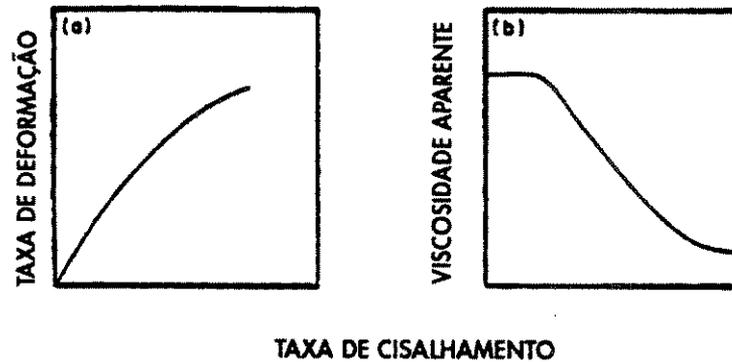


Figura 3.31: Fluido pseudoplástico. (a) curva de escoamento e (b) característica da viscosidade.

A viscosidade aparente (η_a), é expressa pela equação:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}; \quad (3.10)$$

Os fluidos pseudoplásticos exibem comportamento Newtoniano em baixos valores de taxas de deformação e altos valores de taxas de deformação.

A viscosidade de um fluido pseudoplástico sempre deve ser mencionada juntamente com a taxa de deformação em que foi medida. As expressões para ($\dot{\gamma}$) taxa de deformação, e (τ), taxa de cisalhamento, são mais complexas para fluidos pseudoplásticos que para fluidos Newtonianos.

O comportamento pseudoplástico resulta em característica que difere significativamente do comportamento dos fluidos Newtonianos. As características de escoamento laminar em de tubos circulares são apresentados na figura 3.32. A figura 3.25 apresenta os modelos reológicos de fluidos.

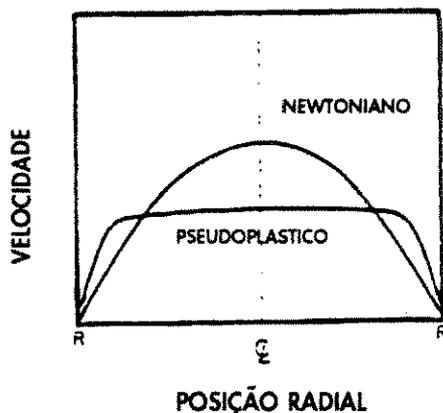


Figura 3.32: Taxa de deformação em função da velocidade do impulsor a várias distâncias da extremidade da turbina. (adaptado de Charles, 1978)

A comparação do escoamento de fluidos Newtonianos, e do escoamento pseudoplástico pode ser observado a partir do perfil de velocidade relativamente plano com gradientes somente próximos à parede e conseqüentemente taxas de deformação que são predominantemente altas perto da parede, e muito baixas nas outras regiões. Esse fato proporciona uma interferência nos processos de transferência de massa e de calor. Em tanques agitados a taxa de deformação é muito maior próximo à turbina do agitador, conseqüentemente a viscosidade do fluido é baixa próximo às pás da turbina e alta em regiões mais distantes. A figura 3.33 apresenta o efeito de taxa de deformação em função da velocidade do impulsor em várias distâncias da extremidade de um impulsor tipo turbina.

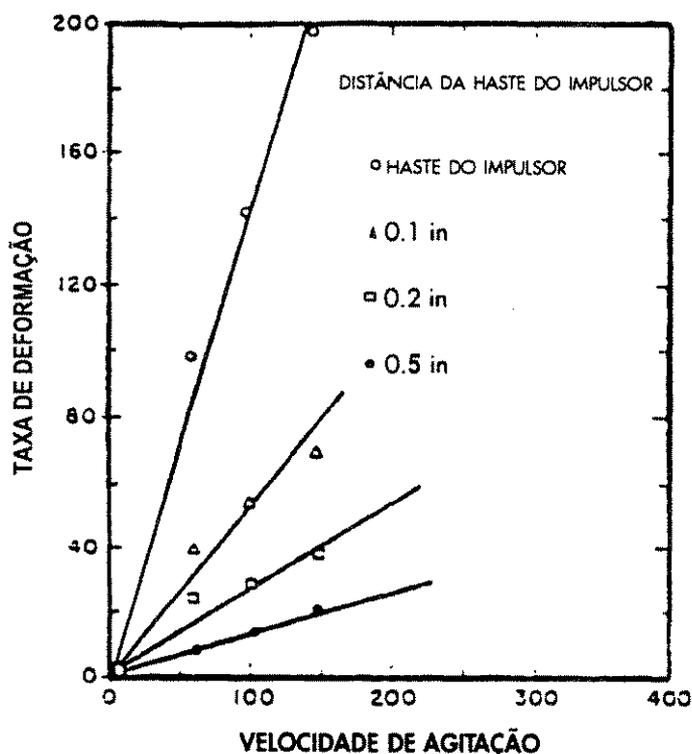


Figura 3.33: Taxa de deformação (s^{-1}) em função da velocidade de agitação (rpm) em várias distâncias do impulsor da turbina. (adaptado de Charles, 1978)

Uma variedade de expressões matemáticas têm sido desenvolvidas para correlacionar a viscosidade de fluidos não-Newtonianos, porém nenhuma é completamente satisfatória para todos os fluidos e nem para o intervalo completo da taxa de deformação para um dado fluido.

O modelo da lei da Potência expresso pela equação 3.11, é o mais amplamente utilizado devido à sua simplicidade.

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (3.11)$$

onde (K) é o índice de consistência (na unidade pseudopoise) e n é o índice da lei da potência. Em geral (n) e (K) são constantes somente para um determinado intervalo de taxa de deformação.

Para os fluidos pseudoplásticos, são válidas as seguintes considerações:

(n) é menor que a unidade; quanto menor o n mais rápido é o declínio da viscosidade com o aumento da taxa de deformação e mais pronunciados são os efeitos

da pseudoplasticidade sobre o escoamento e sobre os outros fenômenos de transporte.

(K) é uma medida direta da viscosidade a uma dada taxa de deformação, quanto maior o (K) maior a viscosidade a uma dada taxa de deformação.

Entretanto, deve ser entendido que valores particulares de (K) e (n) são válidos somente para um determinado intervalo de taxa de deformação.

Outros modelos matemáticos para fluidos pseudoplásticos como os de Eyring, Powell-Eyring, Prandtl, e Williamson, são usualmente mais difíceis para aplicar do que a lei da potência.

Outros fluidos não-Newtonianos cujas viscosidades aumentam com o aumento da taxa de deformação são chamados de dilatantes. Esse comportamento não tem sido encontrado para caldos de fermentação.

Muitos fluidos de culturas microbianas exibem a taxa de cisalhamento mínima, mas nem todos se comportam como plástico de Bingham.

Os caldos fúngicos em sua maioria exibem tensão de cisalhamento mínima que está associada à estrutura do micélio emaranhado e à ruptura ou quebra dessa estrutura após a aplicação de uma tensão maior que a taxa de cisalhamento mínima. Os fluidos que exibem comportamento semelhante ao Newtoniano, a partir do escoamento ter sido iniciado são chamados de plásticos Binghamianos.

Roels *et al.* (1974 *apud* Charles, 1978) desenvolveram um modelo reológico que incorpora explicitamente a estrutura micelial e que está baseado na equação da viscosidade de Casson:

$$(\tau)^{\frac{1}{2}} = (\tau_y)^{\frac{1}{2}} + K_c (\dot{\gamma})^{\frac{1}{2}} \quad (3.12)$$

Os autores encontraram que a equação de Casson, que incorpora termos da lei da potência e das equações dos plásticos de Bingham, fornece dados da correlação da viscosidade superior para certas linhagens de *Penicillium chrysogenum*.

3.3.3. Escoamentos turbulentos e complexos

O número de Reynolds, importante parâmetro adimensional, que representa a relação das forças inerciais e forças viscosas, em geral depende da geometria do sistema. Assim, para tubos de seção circular, pode ser calculado pela relação:

$$N_{Re} = \frac{D\bar{u}\rho}{\eta} \quad (3.13)$$

onde, D é o diâmetro do tubo, u velocidade do fluido, ρ densidade do fluido e η viscosidade do fluido, enquanto que para vasos agitados, é expresso por:

$$N_{Re} = \frac{d_i^2 \cdot N \cdot \rho}{\eta} \quad (3.14)$$

onde, N é a velocidade do impulsor e d_i é o seu diâmetro. A aplicação destas definições é direcionada para fluidos Newtonianos, porém um tanto complicada para fluidos não-Newtonianos, uma vez que não fica claro qual o intervalo de viscosidade aparente que deveria ser usado. Vários pesquisadores têm desenvolvido e testado métodos empíricos que proporcionem resolução adequada para esta dificuldade para muitas situações de interesse em biotecnologia. Metzner e Otto (1957) e Metzner e Taylor (1960) *apud* Charles (1978) e Metzner *et al.* (1961) mostraram que para muitos fluidos não-Newtonianos, a taxa de deformação na região da extremidade de uma turbina em tanque agitado é dada por:

$$\dot{\gamma} = k \cdot N \quad (3.15)$$

onde, k (fator de proporcionalidade) deve ser tomado como aproximadamente 10 para os impulsores tipo turbina, pelo menos para a maioria dos fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos. Uma compilação mais extensa de valores de k para vários tipos de impulsores e para fluidos Binghamianos e dilatantes pode ser encontrada nos trabalhos de Calderbank e Moo-Young (1959). Foram desenvolvidas correlações generalizadas para o cálculo das exigências de potência e do número de Reynolds em qualquer situação, baseadas na viscosidade (equação 3.10) avaliada à taxa de deformação da equação 3.15 e plotando-a contra o número adimensional de Potência, N_p expresso por:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d_i^5} \quad (3.16)$$

onde, N_p é o número de potência e P é o requerimento de Potência para a agitação.

3.3.4. Determinação das propriedades reológicas

A escolha do viscosímetro mais apropriado é determinada em parte, pelo intervalo da taxa de deformação a ser estudada. A viscosidade de suspensões é dependente dos parâmetros: forma, tamanho e massa das partículas, flexibilidade, e deformabilidade das partículas, forças de superfície sobre as partículas, concentração das partículas e taxa de deformação. Para as biorreações estes parâmetros podem depender ainda da idade do caldo, da presença ou produção de substâncias extracelulares (especialmente importante nos processos com polissacarídeos) e da estrutura da superfície das partículas. (Metz, *et al.* 1979). Para os concentrados de suspensões miceliais, esses parâmetros têm sido investigados.

Observa-se na literatura que, para o estudo da reologia com caldos fermentativos inicialmente foram muito empregados os viscosímetros do tipo cilindros concêntricos, tipo turbina, tipo capilar, posteriormente em função dos resultados obtidos, vários autores passaram a propor medições com viscosímetros de impulsores de geometrias especiais como helicóide de fita e helicóide de parafuso. Os caldos de fermentação geralmente são não-Newtonianos e influenciados pela morfologia do fungo ao longo do processo. Para os estudos de ampliação de escala, este tipo de investigação é de extrema importância, porém observa-se que recentemente muitos pesquisadores vêm adotando novamente o emprego de viscosímetros convencionais de cilindros concêntricos para a realização da caracterização dos caldos, o que indica que estes devem fornecer resultados fidedignos.

3.3.4.1. Viscosímetro tipo capilar

O tipo mais simples de viscosímetro é o do tipo capilar, o qual deve ser usado com temperatura controlada.

Para fluidos Newtonianos, a viscosidade deve ser medida pela queda de pressão, pela capilaridade e a taxa de escoamento volumétrico. As taxas de deformação e de cisalhamento para escoamento laminar são facilmente calculadas pelas equações 3.17 e 3.18:

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4Q}{\pi R^3} \quad (3.17)$$

$$\tau_w = \frac{\Delta P \cdot R}{2L} \quad (3.18)$$

onde, as equações 3.17 e 3.18 representam a taxa de deformação e taxa de cisalhamento, respectivamente, à capilaridade da parede, Q a vazão volumétrica, ΔP é a queda de pressão, e L e R o comprimento e raio respectivamente à capilaridade. Assim, a viscosidade é expressa por:

$$\eta = \frac{\tau_w}{\dot{\gamma}_w} \quad (3.19)$$

que é a equação de Hagen-Poiseuille.

Para fluidos não-Newtonianos a situação é complicada devido à dependência entre o perfil de velocidade e taxa de deformação, e as características específicas não-Newtonianas do fluido cujas propriedades se deseja determinar. Para o cálculo da viscosidade não-Newtoniana dos dados de capilaridade pode-se usar a equação de Rabinowitsch-Mooney aplicada para qualquer fluido.

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4Q}{\pi \cdot R^3} \left\{ \frac{3}{4} + \frac{1}{4} \cdot \frac{d \log Q / \pi \cdot R^3}{d \log \Delta P \cdot R / 2L} \right\} \quad (3.20)$$

Para cálculo da taxa de cisalhamento na parede é usada a equação 3.18.

3.3.4.2. Viscosímetro de cilindros coaxiais

O viscosímetro de cilindros coaxiais é um viscosímetro rotacional clássico para determinações de viscosidade de fluidos Newtonianos. A determinação de viscosidades de fluidos não-Newtonianos, requer alguns cálculos adicionais, porque a taxa de deformação não está relacionada simplesmente à velocidade rotacional e

fatores geométricos como para fluidos Newtonianos, como expresso na equação 3.7. Os cálculos são semelhantes àqueles requeridos para a solução da equação de Rabinowitsch-Mooney (equação 3.20). Quando suspensões são testadas no viscosímetro Couette ou em outro viscosímetro rotacional tendo uma haste giratória, uma região clara se forma nas vizinhanças devido à sedimentação das partículas por gravidade.

O viscosímetro Brookfield representa uma variação do viscosímetro coaxial. Com braços removíveis, este instrumento pode ser usado para fechar um cilindro giratório em um meio infinito. Nesse caso a taxa de deformação da superfície do cilindro giratório pode ser calculada com razoável precisão pela equação:

$$\dot{\gamma} = \frac{4\pi.N}{n^1} \quad (3.21)$$

onde, n^1 é o coeficiente angular da reta obtida pelo gráfico logarítmico de torque em função de velocidade rotacional. É importante ressaltar que esse equipamento exhibe separação de fases próximo ao cilindro interno, e sedimentação por gravidade das partículas (Charles, 1978).

A seguir são mencionados os autores que a partir de 1990 realizaram trabalhos sobre caracterização reológica fazendo uso de viscosímetro convencional de cilindros concêntricos.

Kemblowsky *et al.* (1990) fizeram medidas das propriedades reológicas do caldo de fermentação com reômetro Rheohelix em linha, aplicando impulsor tipo helicóide de parafuso em caldos de cultura submersa de *Aspergillus niger*.

Bennington *et al.* (1990) determinaram a taxa de cisalhamento mínima para suspensões de polpas de madeira e suspensões de fibra sintética a baixa e média concentração de massa, utilizando viscosímetro Haake RV12 de cilindros concêntricos com 6 rotores de variados diâmetros. Bennington *et al.* (1990) empregando viscosímetro Haake RV12 Rotovisco de cilindros concêntricos realizaram medidas de taxa de cisalhamento crítica com suspensões de polpas de madeira em água, e em soluções aquosas de etanol e de fibras sintéticas (nylon) em soluções aquosas de sacarose.

Ajayi *et al.* (1991) desenvolveram um reômetro de turbina para realização de medidas “on-line” das propriedades reológicas dos caldos de fermentação de *Aureobasidium pullulans*. Foi empregado reômetro com impulsor de turbina conectado ao Rheomat 115 (Contraves).

Zhong *et al.* (1992) empregaram viscosímetro Brookfield à velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm com adaptador BL para determinadas características reológicas, viscosidade aparente, obtendo fluido de comportamento Binghamiano. As medidas foram feitas em caldos de cultura de *Perilla frutescens*.

Ballica *et al.* (1992) empregaram viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVT, com spindle cilíndrico para a caracterização de suspensões de culturas de *Datura stramonium*. Ballica e Ryu (1993) estudaram os efeitos das propriedades reológicas e transporte de massa no desempenho do biorreator para produção de alcalóides tropano por *Datura stramonium*. A caracterização reológica foi realizada usando os viscosímetros Contraves Rheomat 115A e Brookfield (modelo LVT). A suspensão apresentou comportamento pseudoplástico e tensão de cisalhamento mínima. O modelo de Casson se ajustou aos resultados obtidos.

Shi *et al.* (1993) usaram viscosímetro rotativo Brookfield para as determinações em suspensões com células de hibridoma (G2D3) e célula hela (5). A viscosidade aparente foi determinada para 4 concentrações e foram usadas velocidades de 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; 12; 30 e 60 rpm à temperatura ambiente.

Pedersen *et al.* (1993) realizaram fermentações com *Penicillium chrysogenum* em meio complexo. Os caldos fermentativos foram caracterizados usando reômetro Bohlin CS com cilindros (C25) e DG 40/50. O comportamento foi bem caracterizado pelo modelo da lei da potência.

Landon *et al.* (1993) realizaram estudo sobre a reologia da suspensão de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) para produção da dextrana. Eles empregaram para as medidas reológicas o viscosímetro Brookfield modelo LVT.

Curtis e Emery (1993) mostraram que a maioria das instalações com suspensões de células *Nicotiana tabacum* e *Papaver somniferum* exibem comportamento Newtoniano para moderada densidade de células, e que o

comportamento não-Newtoniano é o resultado de alongamento celular observado em poucas células, eles sugerem que deve ser desenvolvido estudo para a monitoração em linha da reometria nas instalações. Neste trabalho foi empregado viscosímetro syncro-elétrico Brookfield de cilindros concêntricos.

Schmidell *et al.* (1994) apresentaram um estudo de caracterização reológica de caldo de cultivo submerso de *Aspergillus* sp. Foi empregado viscosímetro rotacional para as medidas. Os resultados mostraram característica pseudoplástica seguindo o modelo da lei da potência, os autores realizaram as determinações com viscosímetro Brookfield modelo LVT de cilindros concêntricos. O caldo foi identificado como pseudoplástico e de acordo com a lei da potência o índice de comportamento de escoamento (n) permaneceu quase constante, enquanto (K) o índice de consistência, mostrou um comportamento exponencial.

Warren *et al.* (1995) examinaram a reologia e morfologia, em cultura submersa de três actinomicetos (*Saccharopolyspora erythraea*, *Actinomadura roseorufa*, e *Streptomyces rimosus*) que produzem metabólitos secundários de importância comercial. As medidas foram feitas com Viscosímetro Brookfield 2HAT DVII Synchro-Lectric com impulsor “spindle” do tipo disco. O modelo da lei da potência foi aplicado em cada caso. Mas após clarificação e centrifugação os caldos apresentaram característica Newtoniana semelhante à da água.

Ruohang e Webb (1995) empregaram reômetro Bohlin CS para determinações reológicas durante a produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori*, o modelo da lei da potência foi bem ajustado aos resultados obtidos.

Badino Jr. (1997), trabalhando com *Aspergillus awamori* NRRL 3112, apresentou metodologia para as medidas da reologia dos caldos fermentativos “on-line” e “off-line”, empregando reômetro Brookfield, modelo LVT - Synchroelectric com 8 velocidades, munido de dispositivos de cilindros concêntricos nos modelos “UL-adapter” e 18/13R.

Kwon *et al.* (1996) realizaram medidas reológicas de caldos contendo polissacarídeos extracelular produzido pelo *Pestalotiopsis* sp. Foi empregado nas determinações reológicas reômetro digital Brookfield (modelo DV-III, USA) com

adaptador SC4-34. Após análise dos resultados concluiu-se que o fluido apresentou características de pseudoplástico com tensão de cisalhamento mínima. Foram empregados três modelos para análise, o da lei da potência, de Herschel-Bulkley e equação de Arrhenius.

Queiroz *et al.* (1997) propuseram correlações matemáticas que relacionam concentração de biomassa com o parâmetro reológico índice de consistência da lei da potência, K , e outra que relaciona a velocidade específica de crescimento ou velocidade específica de produção da glicoamilase com K . A reologia foi determinada em viscosímetro analógico Brookfield, modelo LVT usando o “small chamber”.

Os resultados obtidos mostraram que no começo do cultivo o fluido apresentou características de fluido Newtoniano ($n=1$) com uma baixa viscosidade. Entretanto, com o aumento da massa celular, o caldo passou a pseudoplástico, mostrando uma rápida redução no índice de escoamento e aumento no índice de consistência, resultando em um considerável aumento da viscosidade aparente e indicando uma predominância de crescimento na forma filamentosa.

Tucker *et al.* (1992) desenvolveram um método de medidas dos parâmetros morfológicos por análise de imagem no meio disperso de um caldo fermentativo com *Streptomyces clavuligerus* e *Penicillium chrysogenum*.

3.3.4.3. Efeitos de deslizamento na parede e sedimentação da suspensão nos viscosímetros

Muitas vezes, a caracterização reológica dos caldos pode ser dificultada pelo desconhecimento da morfologia, fundamentos reológicos, pelo emprego de viscosímetro nem sempre apropriado, particularmente para a determinação da tensão de cisalhamento mínimo, e por problemas de operação do instrumento como por exemplo separação de fases e sedimentação de partículas (Allen e Robinson, 1987).

Bongenaar *et al.* (1973) e Charles (1978) *apud* Allen e Robinson (1987) acenaram para o problema que ocorre sobre as disparidades entre os parâmetros reológicos estimados para um dado caldo que resultam do uso do padrão “absoluto”, de um aparato de medição reológica tal como viscosímetros de cilindros concêntricos ou “pipeline” que

estão propensos a sedimentação da partícula e a velocidade de deslizamento próxima à parede.

Allen e Robinson (1987) trabalharam com caldos de fermentações com *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Streptomyces levoris* e relataram que a despeito das discussões na literatura, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para a comparação dos resultados de vários viscosímetros e observar e avaliar estes efeitos de deslizamento. Estes autores apresentaram um estudo comparativo com viscosímetros “pipeline”, cilindro coaxial e com impulsores de turbina e helicóide de fita com ênfase nos efeitos de deslizamento na parede e sua importância no projeto de biorreator. O emprego dos viscosímetros do tipo “pipeline” e de cilindros concêntricos era criticado por causa do efeito do deslizamento junto à parede. Os resultados obtidos pelos autores, neste trabalho, indicaram que os efeitos de deslizamento na parede foram detectados nos viscosímetros tipo “pipeline” de diâmetro pequeno e no viscosímetro de cilindros concêntricos não foi detectado com grande significado. Goldsmith e Mason (1967), Maude e Whitmore (1956), Karnis *et al.* (1966) *apud* Allen e Robinson (1987) mencionaram que os efeitos de deslizamento alteravam a leitura da viscosidade de forma mais acentuada no viscosímetro tipo “pipeline” do que no de cilindros concêntricos. O perfil de velocidade em cada instrumento é diferente e isto altera o efeito de deslizamento na medição. No “pipeline” a taxa de deformação varia de zero no centro do tubo até o valor máximo na parede, mas nos cilindros concêntricos a taxa de deformação é aproximadamente uniforme através da espessura anular. Os autores observaram que para todos os viscosímetros testados, a taxa de cisalhamento a uma dada taxa de deformação era função da concentração de biomassa, e que a origem do comportamento não-Newtoniano dos caldos era devido às células filamentosas. Eles obtiveram bom ajuste das taxas de cisalhamento medidas no início e final da determinação reológica com o viscosímetro de cilindro coaxial à mesma taxa de deformação. Com relação ao viscosímetro de cilindros coaxiais, Allen e Robinson (1987) perceberam a presença de um anel estacionário de caldo no espaço anular e somente uma fina camada de suspensão adjacente ao cilindro interno era cisalhada. A presença do anel era função da velocidade do rotor, sendo que a partir de uma determinada velocidade do rotor o anel desaparecia. Os autores concluíram que, para ter leituras fidedignas, era necessário evitar a formação deste anel. A tabela 3.5 apresenta resultados comparativos das medidas reológicas realizadas com 4 tipos de instrumentos e seus efeitos na medição dos coeficientes de transporte dos biorreatores.

Tabela 3.5: Efeito das medidas reológicas realizadas em tipos de equipamentos diferentes para predição dos coeficientes de transporte nos biorreatores.

Viscometer	Power-Law Parameters		Mass Transfer				Heat Transfer	
			$\frac{k_L a_{(viscometer)}}{k_L a_{(MV2)}}$		$\frac{h_{(viscometer)}}{h_{(MV2)}}$			
Bioreactor								
	K (Pas ⁿ)	n	Shear Rate Range ^b (s ⁻¹)	Stirred Tank (Yagi & Yoshida ²⁰)		Airlift at U ₅₀ = 5 cm/s		Airlift
				250 rpm	750 rpm	Nakanoh & Yoshida ²⁵	Deckwer et al. ²³	U ₅₀ ≤ 10 cm/s Nishikawa et al. ²¹
MV2	2.1	0.40	10-600	1	1	1	1	1
15.4-mm Pipe	0.9	0.56	45-205	1.09	1.02	1.0	0.99	1
5.8-mm Pipe	0.17	0.70	1000-2600	1.7	1.5	1.28	2.11	1.35
TI3	6.9	0.21	1-19	0.33	0.91	0.97	0.9	0.96

^aRheological data from run no. AN7PIPE 5 (FIGURE 4d, 15 gdw/L). Predictions were based on correlations from literature references given in the table.

^bThis is the shear rate range over which the power-law parameters were fit.

Fonte: Allen e Robinson, 1987.

Resultados semelhantes foram obtidos por Reuss *et al* 1982, indicando que a seleção de um viscosímetro é muito importante na determinação dos dados reológicos para um caldo micelial. A concordância aceitável entre os viscosímetros de cilindros coaxiais, e “pipeline” para diâmetros maiores, e o impulsor do tipo helicóide de fita, sugere que os efeitos de deslizamento não são críticos, desde que o viscosímetro apropriado seja escolhido.

O viscosímetro de turbina tem sido usado por vários pesquisadores (Allen e Robinson, 1987, Bongenaar *et al.* 1973, Metz *et al.* 1979, Reuss *et al.* 1982). Os resultados obtidos indicaram que esse viscosímetro produziu viscosidades aparentes maiores do que com outros viscosímetros testados. A provável razão para isso deve ser que, a taxa de deformação assumida seja proporcional à velocidade do impulsor e que a constante de proporcionalidade, k , independe das propriedades reológicas, equação 3.15.

Nagata (1975) e Brauer (1979) *apud* Allen e Robinson 1987 determinaram a dependência da taxa de deformação média sobre a reologia do fluido. Esses resultados mostram que o método do impulsor pode fornecer dados reológicos imprecisos para formulação fundamental reológica e modelos de transporte para suspensões. Para suspensões que tem partículas muito grandes, “pellets”, as propriedades reológicas podem ser medidas com um impulsor de turbina. Em tais casos os resultados indicaram que as medidas reológicas poderiam ser úteis para a comparação de quantidades relativas e não para usar como medidas absolutas.

3.3.5. Dados reológicos para fluidos de cultivo microbiano

3.3.5.1. Caldos miceliais

As propriedades reológicas dos caldos miceliais são usualmente controladas pela concentração e estado morfológico do micélio. A única exceção ocorre quando,

o meio de iniciação da cultura contem altos níveis de sólidos não solúveis ou altas concentrações de substratos de alto peso molecular como amido de milho.

As condições morfológicas influenciam a natureza da reologia do caldo. Os fungos, durante o seu crescimento, podem passar de filamentos dispersos para estruturas em completa suspensão e assim originando a tensão cisalhante mínima e pseudoplasticidade. Podem também crescer como “pellets”, e apresentarem um comportamento aparentemente Newtoniano e de baixa viscosidade, embora seja esperado algum grau de resposta não-Newtoniana, devido à deformabilidade dos mesmos (Blanch e Bhavaraju, 1976, Metz *et al.*, 1979, Olsvik e Kristiansen, 1994, Olsvik *et al.*, 1993, Smith e Kristiansen, 1993 e Schügerl *et al.*, 1988).

3.3.5.2. Controle das fermentações

Olsvik e Kristiansen (1992b) estudaram o controle da viscosidade do caldo por meio de diluições ou diluições em combinação com controle de crescimento, em fermentações com *Aspergillus niger* com um sistema de medida “on-line”. Observaram que a diluição do caldo a um K predeterminado não foi muito satisfatória no controle da viscosidade da suspensão. Quanto maior era a viscosidade, menor era o intervalo de tempo em que a diluição mostrava algum efeito, e a morfologia da cultura por sua vez, K/C_X (C_X representa a concentração celular), não era afetada pelas diluições.

Olsvik e Kristiansen (1992a) estudaram a influência da tensão de oxigênio, concentração de biomassa, e velocidade específica de crescimento em fermentação com *Aspergillus niger* em cultura contínua. As medidas reológicas foram feitas “on-line”, usando sistema de reômetro com impulsor. O efeito da velocidade específica de crescimento na reologia do caldo mostrou-se fortemente influenciada pela concentração do oxigênio dissolvido, OD. Em concentrações de OD por volta de 10% da saturação, K aumentou com a taxa de diluição, e em concentrações de OD abaixo de 10 % K diminuiu com a elevação da taxa de diluição. A maior influência da variação da concentração de OD na viscosidade do caldo foi encontrada nas menores

taxas de crescimento concentrações de OD. O parâmetro K/C_x , que fornece uma simples descrição da estrutura ou morfologia da cultura, aumentou com a concentração de biomassa.

Kemblowski *et al.* (1990) Ajayi *et al.* (1991) apresentaram uma montagem para medir as propriedades reológicas on-line de caldos de fermentação.

Olsvik *et al.* (1993) realizaram fermentações em quimiostato de 7 litros com *A. niger*. As medidas reológicas foram feitas em linha, enquanto a análise de imagens na saída eram usadas para as determinações da morfologia incluindo caracterização dos agregados. Smith e Kristiansen (1993) apresentaram revisões sobre bioprocessos fúngicos, sugerindo o emprego das técnicas de análise de imagens. Tucker *et al.* (1992) apresentaram uma metodologia toda automatizada para monitorar a morfologia do micélio nas fermentações fúngicas por meio de análise de imagens.

Olsvik e Kristiansen (1994) relataram uma forma de controlar a reologia por meio de manipulações de morfologia dos agregados miceliais ou das propriedades da superfície do micélio. Os parâmetros como, concentrações de nutriente e natureza do nutriente limitante, velocidade de crescimento específico e qualidade de mistura influenciam a morfologia e a composição da parede celular bem como as propriedades reológicas do caldo fermentativo.

3.3.5.3. Culturas de bactérias e leveduras

Nos caldos de cultivo com bactérias e leveduras, como as células não possuem crescimento em forma de micélio, a viscosidade do caldo passa a ser função apenas da concentração de células (Charles, 1978). Kemblowski e Kristiansen (1986), trabalhando com caldos de fermentações de *Aureobasidium pullulans*, determinaram as curvas de escoamento dos líquidos, com um sistema de impulsor, e apresentaram um método de calibração do sistema. Foi apresentada a construção de um sistema de medida e a técnica para a determinação de viscosidade dos líquidos de processos fermentativos como um primeiro degrau de um reômetro para medidas em linha.

3.3.6. Mistura

Para um reator de mistura, a viscosidade alta e comportamento não-Newtoniano do caldo acarreta uma diminuição da homogeneidade (aparecimento de regiões estagnantes) e redução da produtividade. Homogeneidade perfeita é o estado de mistura desejado para fermentadores tipo tanque agitados.

O tempo de mistura é definido como o tempo requerido para atingir um grau específico de uniformidade após um pulso de um traçador. Charles, 1978 apresentou correlações para tempo de mistura em meios com gás e sem gás, para caldos Newtonianos e não-Newtonianos. Esta questão está ligada diretamente à investigação da manutenção do oxigênio dissolvido no meio, bem como coeficiente global de transporte de massa, e exigência de potência.

Alguns pesquisadores estudaram problemas típicos de reologia de fluidos provenientes de processos fermentativos, tais como comportamento viscoso de suspensões de leveduras, o processo de transporte de caldo micelial e polissacarídeos com o objetivo de melhorar o tempo de mistura em reatores do tipo tanque agitado e determinar o tipo de agitador mais adequado. Nesses processos, a viscosidade do meio é controlada por um produto microbiano extracelular. Para fermentação com *P. chrysogenum*, demonstrou-se que o agitador do tipo helicóide de fita, torna constante o tempo de mistura num intervalo amplo de viscosidades (Queiroz *et al.*, 1997; Schmidell *et al.*, 1994; Badino Jr., 1991).

3.3.7. Rendimento e produtividade em processos em batelada e em batelada alimentada

No projeto, operação e análise de processos com fluidos não-Newtonianos, sempre devem ser considerados os problemas e incertezas impostas pelo ambiente heterogêneo (mistura imperfeita) e taxas de transporte de massa e calor baixas, os quais se não forem sanados, acarretarão em: rendimentos inferiores, controle do processo prejudicado, análise duvidosa do processo, projeto complexo e oneroso. Vários autores estudaram a reologia das suspensões fúngicas, para vários processos

em reatores agitados. Os dados foram analisados por meio de modelos reológicos para as viscosidades de suspensões fúngicas tais como o modelo da lei da potência, o modelo de Casson e o plástico de Bingham (Metzner *et al.*, 1961, Blanch e Bhavaraju, 1976, Charles, 1978, Metz *et al.*, 1979, Reuss *et al.*, 1982, Bongenaar *et al.*, 1973).

3.3.8. Processos em batelada e batelada alimentada

Bayer *et al.* (1986) realizaram fermentações em batelada alimentada com *C. acremonium* para a produção de cefalosporina C monitorando o processo em linha. Para a realização do trabalho os autores mantiveram na fase de crescimento a fermentação com alimentação descontínua. Na fase da produção de antibiótico foi feita fermentação contínua com vazão de alimentação variável. Foi empregado meio complexo contendo 100 g/L de farinha de amendoim e 5g/L de metil oleato e demais componentes. Foi mantido um módulo de filtração “hollow fiber” de escoamento cruzado para remoção dos sólidos durante a amostragem.

Bayer *et al.* (1989) usaram linhagem mutante de *C. acremonium* (Ciba Geigy) para obtenção de cefalosporina C, em biorreator tipo torre “airlift” com “loop”, com monitoração em linha e com 60 litros de meio. Durante a fase exponencial de crescimento a viscosidade atingiu valores que dificultou o processo, tendo sido necessário controlar o crescimento para evitar a limitação pelo oxigênio dissolvido. Mesmo assim as produtividades específicas foram comparáveis àquelas obtidas em reator tipo tanque agitado e o coeficiente de rendimento de formação do produto obtido em relação à concentração do substrato foi o dobro. Os autores conseguiram obter controle do processo pelo sistema em linha da glicose, cefalosporina C, metionina, e precursores da síntese da cefalosporina C.

Shügerl *et al.* (1988) estudaram a influência do meio de cultura na morfologia dos fungos filamentosos. Os autores examinaram os efeitos das concentrações da farinha de amendoim, oxigênio dissolvido e glicose sobre a morfologia, reologia do caldo, crescimento e produção de cefalosporina C por células livres de *Acremonium chrysogenum*.

Shügerl (1988) analisou os pré-requisitos para o emprego das técnicas em linha para monitorar e controlar o processo de produção biotecnológico. Foram usados processos de controle para a produção de penicilina V e cefalosporina C em reatores de tanque agitado e reator de torre "airlift" com "loop". Os resultados "on-line" e "off-line" foram comparados com diferentes métodos analíticos. A aplicabilidade das técnicas para o controle do processo foi mostrada em vários exemplos.

Schügerl (1990) e Bayer *et al.* (1990) fizeram uma comparação do desempenho dos biorreatores do tipo tanque agitado e tipo torre "airlift" com "loop" os mesmos empregados por Shügerl *et al.* (1988). Os resultados obtidos mostraram que as concentrações celulares, produtividades volumétricas e potência específica aplicada foram maiores em reator tipo tanque agitado do que no reator tipo "airlift". Por outro lado a eficiência de transferência de oxigênio, as produtividades específicas e a potência aplicada, consumos de substrato e oxigênio, bem como os coeficientes de rendimento de formação de produto foram maiores para os reatores tipo torre. Os autores ressaltaram que um processo de produção desenvolvido em um determinado fermentador não deve ser generalizado a outros tipos de reatores, e que a composição ótima do meio de cultivo é bastante dependente do tipo de fermentador.

Bayer *et al.* (1989) usaram meio de cultura complexo para produção de cefalosporina C com *C. acremonium*. Foi empregado reator tipo tanque agitado e foi examinada a influência da concentração de farinha de amendoim na produtividade associada à morfologia. Foram utilizados, para estudo comparativo, dois tipos de reatores, um tipo tanque agitado de 40 litros e outro tipo torre "airlift" com "loop" de 60 litros. No reator tipo tanque com o emprego de 30 g/m³ de farinha de amendoim houve uma produção de 5-6 kg/m³ de cefalosporina C e com o emprego de 100 kg/m³ de farinha de amendoim o reator produziu 10-11 kg/m³ de cefalosporina C. A comparação com o reator tipo torre foi realizada usando 30 kg/m³ de farinha de amendoim concentração definida para manutenção da viscosidade em valor operacional, e a produtividade alcançada foi de 4,5-5,0 kg/m³ de cefalosporina C. Foi observado o comportamento da viscosidade ao longo do processo e a concentração

de oxigênio dissolvido. Os autores, após análises, concluíram que por meio do controle químico e físico das células na pré cultura e na cultura principal, o processo investigado para obtenção de cefalosporina C pode ser adaptado para diferentes reatores.

Herold *et al.* (1988) investigaram a produção de cefalosporina com *C. acremonium* W 53.2.53. (Ciba Geigy) em biorreator de tanque agitado de 20 litros operando em batelada alimentada. Foi usada a concentração de 100 kg/m^3 de farinha de amendoim. Pela otimização da operação da batelada alimentada e aumento na concentração de fosfato no caldo foi atingida uma concentração final de cefalosporina C de 12 kg/m^3 . O crescimento e formação do produto foram acompanhados por análise em linha.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Microrganismos

Os microrganismos usados neste trabalho foram cedidos pela CODETEC (Campinas, SP) e pela Fundação Tropical de Pesquisa Tecnológica “André Tosello”.

4.1.1.1. Microrganismos para a produção de Cefalosporina C

Para as fermentações foi utilizada a linhagem de fungo *C. acremonium* ATCC 48272 (C-10) ou CCT 1365*, que segundo a literatura atingiu mais de 18000 µg/mL CPC em meio complexo e 3600 µg/mL CPC em meio sintético (Shen *et al.*, 1986).

4.1.1.2. Microrganismos para a determinação de Cefalosporina C

Para as determinações de cefalosporina C produzida foi utilizada a linhagem de bactéria *Alcaligenes faecalis* ATCC8759 ou CCT 1434 (Claridge e Johnson, 1962).

4.1.2. Meios de cultura

4.1.2.1. Meios de esporulação e manutenção

A composição do meio sólido para cultivo da linhagem de *C. acremonium* está apresentada na tabela 4.1

* CCT- Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa Tecnológica “André Tosello”.

Tabela 4.1: Composição do meio sólido para a manutenção de *C. acremonium* ATCC 48272 *.

componentes	g/L
sacarose	20,0
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
extrato de levedura	4,0
peptona	4,0
ágar	15,0

* água destilada q.s.p.; pH 7,2 ±0,1

4.1.2.2. Meio de cultivo e manutenção do *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750

Para a manutenção e cultivo da bactéria *Alcaligenes faecalis*, a composição do meio sólido ágar nutriente está mostrada na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Composição em (g/L) de meio sólido para a manutenção de *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 *.

componentes	g/L
peptona	5,0
extrato de carne	3,0
NaCl	5,0
ágar	18,0

* água destilada q.s.p.; pH 7,0 ±0,1

4.1.2.3. Meios para as fermentações em frascos agitados

Nas fermentações em frascos agitados foram empregadas várias combinações dos açúcares glicose, frutose e sacarose nos meios, apresentadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Esquema das combinações das fontes de carbono usadas nos meios para as tres etapas do bioprocesso em frascos agitados.

ensaio	germinação	inóculo	fermentação
11	glicose (G)	glicose (G)	glicose (G)
12	glicose (G)	glicose (G)	sacarose (S)
13	glicose (G)	glicose (G)	glicose+frutose (GF)
14	glicose (G)	glicose (G)	glicose+sacarose (GS)
15	glicose (G)	glicose (G)	frutose (F)
21	glicose (G)	sacarose (S)	glicose (G)
22	glicose (G)	sacarose (S)	sacarose (S)
23	glicose (G)	sacarose (S)	glicose+frutose (GF)
24	glicose (G)	sacarose (S)	glicose+sacarose (GS)
25	glicose (G)	sacarose (S)	frutose (F)
31	glicose (G)	glicose+frutose (GF)	glicose (G)
32	glicose (G)	glicose+frutose (GF)	sacarose (S)
33	glicose (G)	glicose+frutose (GF)	glicose+frutose (GF)
34	glicose (G)	glicose+frutose (GF)	glicose+sacarose (GS)
35	glicose (G)	glicose+frutose (GF)	frutose (F)
	sacarose (S)	-	-
	glicose+frutose (GF)	-	-

4.1.2.3.1. Meio para a germinação e para o preparo do inóculo

A composição dos meios são apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4: Composição do meio de cultura básico para a germinação e preparação de inóculo empregado em todas as fermentações em frascos agitados *.

Componentes	g/L
DL-metionina	5,0
ácido oleico	1,5
KH ₂ PO ₄	2,3
K ₂ HPO ₄	5,8
NH ₄ CH ₃ CO ₂	8,8
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,16
Na ₂ SO ₄	16,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,68
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6
MnSO ₄ .H ₂ O	0,64
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,64
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
CaCO ₃	2,0

* água destilada q.s.p.; pH 7,0 ±0,1

Tabela 4.5: Relação quantitativa dos açúcares contidos no meio nutriente básico apresentados na Tabela 4.4.

ensaios	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	frutose (g/L)
11 a 15	20,0	-	-
21 a 25	-	19,0	-
31 a 35	10,0	-	10,0

4.1.2.3.2. Meios para a fase de produção da Cefalosporina C

A composição dos meios para a produção de CPC são apresentados nas tabelas 4.6 e 4.7.

Tabela 4.6: Composição do meio nutriente básico empregado na fase de obtenção de CPC para todos os ensaios *.

Componentes	g/L
ácido oleico	1,5
DL-metionina	5,0
NH ₄ CH ₃ CO ₂	8,8
KH ₂ PO ₄	1,08
K ₂ HPO ₄	2,97
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,16
Na ₂ SO ₄	16,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,68
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6
MnSO ₄ .H ₂ O	0,64
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,64
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
CaCO ₃	2,0

* água destilada q.s.p.; pH 7,0 ±0,1

Tabela 4.7: Relação quantitativa dos açúcares contidos no meio básico apresentado na Tabela 4.6.

ensaios	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	frutose (g/L)
11, 21 e 31	64,89	-	-
12, 22 e 32	-	61,65	-
13, 23 e 33	32,45	-	32,45
14, 24 e 34	27,0	36,0	-
15, 25 e 35	-	-	64,89

4.1.2.4. Meios para as fermentações realizadas em biorreator de tanque agitado

4.1.2.4.1. Meios para a germinação e preparação do inóculo

A formulação dos meios de cultura foi baseada nos estudos de Demain *et al.*, 1963, e nos resultados obtidos nas fermentações feitas em frascos agitados (item 4.1.2.3). Para essa fase, meio com a composição apresentada tabela 4.4, com 30,0 g/L de glicose foi utilizado.

4.1.2.4.2. Meios para a fase de produção da cefalosporina C

A composição apresentada na tabela 4.6 foi baseada nos trabalhos de Demain *et al.* (1963). Porém, os trabalhos de Zhang *et al.* (1987 e 1988), Sawada *et al.* (1980); Shen *et al.* (1984); Behmer e Demain (1983); Zanca e Martin (1983), Dennen e Carver (1969), contribuíram para o ajuste da concentração de alguns compostos.

Para essa etapa foi empregado meio básico da tabela 4.6, a menos do carbonato de cálcio que foi substituído pelo sulfato de cálcio bi-hidratado na concentração de 3,43 g/L e antiespumante à 0,03% vol. Além disso o biorreator de tanque agitado foi operado em batelada e em batelada alimentada.

Tabela 4.8: Concentração de glicose e sacarose empregadas no meio de cultura básico apresentado na tabela 4.6 para os experimentos em tanque agitado na fase de obtenção de cefalosporina C.

ensaio	operação	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	glicose/sacarose
A	batelada alimentada	81,0	100,0	0,81
B	batelada alimentada	27,0	126,0	0,21
C	batelada alimentada	26,0	187,0	0,14
D	batelada	27,0	36,0	0,75

4.1.3. Equipamentos

4.1.3.1. Esterilização

Foram empregadas autoclaves da marca FABBE, por 15 minutos a 121°C, para a esterilização de todas as soluções, meios de cultura, reator, vidrarias e demais utensílios necessários à realização dos experimentos. Foi também usada para a esterilização de algumas vidrarias uma estufa da marca FANEM, a 180°C por 3 horas.

4.1.3.2. Incubadora

Para o cultivo do microrganismo em meio sólido, foi utilizada a incubadora com circulação forçada da marca FAUVEL controlada a $\pm 25^\circ\text{C}$ por 7 dias.

4.1.3.3. Câmara agitadora

Foi usada mesa rotativa marca Superhom, modelo G-25, com controles de temperatura e velocidade de agitação para a obtenção do germinado e inóculo.

4.1.3.4. Centrífuga refrigerada

Foi utilizada a centrífuga refrigerada da marca INCIBRÁS, modelo SPIN VI, com capacidade para 16 tubos de centrífuga, cada um com capacidade de 35 mL.

4.1.3.5. Câmara asséptica

Foi usada câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, equipada com bico de Bunsen e lâmpada germicida UV, para todas as manipulações que exigiam ambiente estéril.

4.1.3.6. Biorreator do tipo tanque agitado e aerado

Foi usado biorreator BIOFLO II da New Brunswick, de 5 litros de volume útil, com controle de temperatura, agitação, aeração, pH e equipado com bombas peristálticas para a realização das fermentações (figura 4.1).

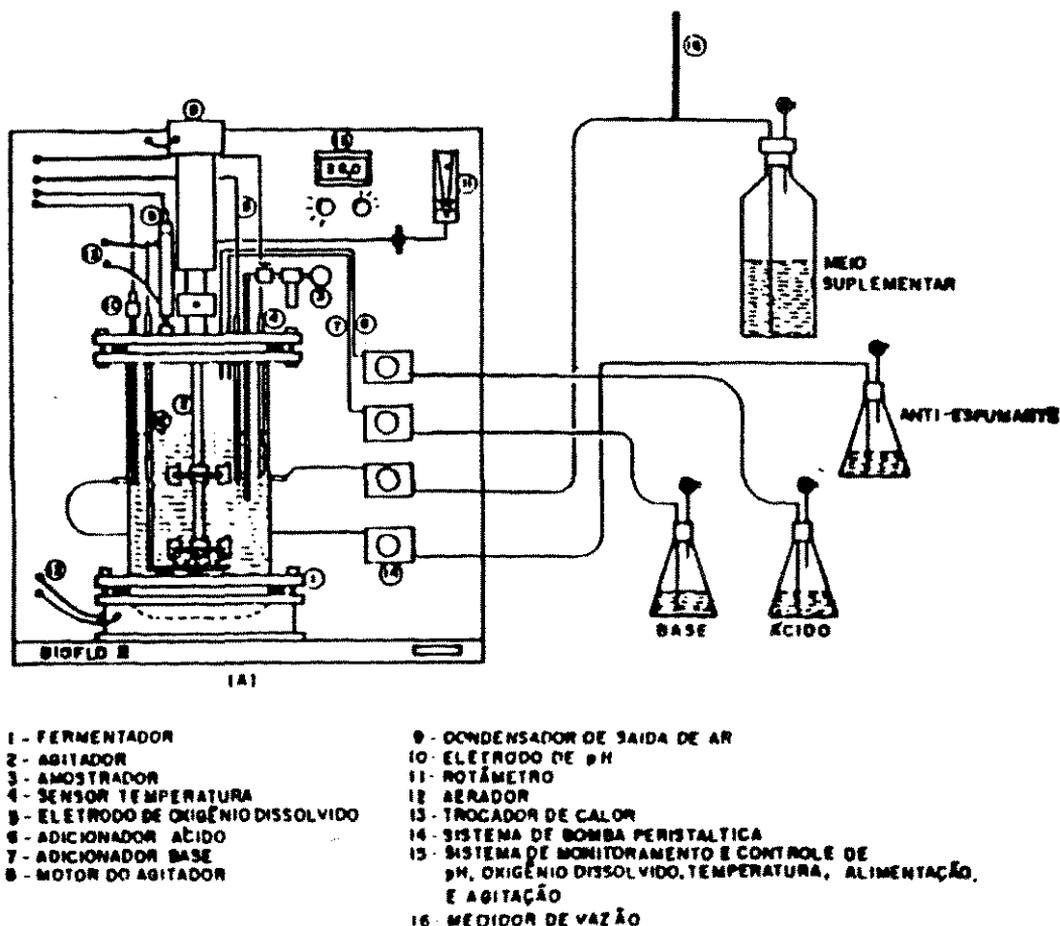


Figura 4.1: Esquema geral do equipamento utilizado.

4.1.3.7. Microscópio com câmera fotográfica

Foi utilizado o microscópio Olympus modelo BX-50 equipado com câmera Colorvideo Sony e câmera digital DXC 107A/107AP acoplada a uma objetiva Olympus U-TV1X. Para a obtenção das fotomicrografias, foram empregadas objetivas Olympus 20X/0,5; 40X/0,75 e 100X/1,30.

4.1.3.8. Viscosímetro

Foi utilizado o viscosímetro Brookfield modelo LVT, com 3 conjuntos de cilindros concêntricos, adaptador “Ultra Low”, 21/13R e 15/7R, estes dois últimos com adaptador para amostras de pequeno volume para as determinações reológicas.

4.2. Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho houve necessidade do estabelecimento de metodologias voltadas à manipulação do microrganismo, preparo dos meios fermentativos, determinações experimentais para o acompanhamento dos bioprocessos, e outros.

Sendo o *C. acremonium* estritamente aeróbio, o estudo da transferência de OD durante o bioprocessos é de extrema importância, porém no presente trabalho os experimentos foram realizados sempre em condições em que o OD não fosse limitante.

4.2.1. Métodos experimentais

4.2.1.1. Preparação do microrganismo

A partir de ampolas contendo *C. acremonium* 48272 liofilizado, foi realizado o procedimento para reativação do fungo em placas de petri com 15 mL de meio sólido a 25°C por 10 dias. Após a reativação foram realizados repiques em 20 tubos com 10 mL de meio sólido, com o material obtido nas placas. Esses tubos foram

colocados em incubadora a 25°C por sete dias, e posteriormente estes tubos foram armazenados em geladeira a 4°C.

Antes de cada experimento, era feito um repique de um tubo armazenado em geladeira para um frasco de Roux contendo o meio sólido de esporulação (tabela 4.1). Esse procedimento era feito com o auxílio de alça de platina e solução salina a 0,9% de NaCl, em ambiente asséptico.

O cultivo em meio sólido no frasco de Roux, era feito em incubadora durante sete dias com temperatura controlada em 25°C.

4.2.1.2. Preparação dos meios

Os meios tanto para a germinação, inóculo ou fermentação eram adequadamente preparados nas concentrações exigidas e posteriormente eram esterilizados em autoclave. Na etapa de esterilização, a solução dos açúcares juntamente com carbonato de cálcio, o ácido oleico puro e a solução dos demais nutrientes eram autoclavados separadamente. Somente após a esterilização, era feita a mistura dos três conjuntos de componentes em câmara asséptica.

4.2.1.3. Bioprocesso conduzido em frascos agitados para a produção de CPC

4.2.1.3.1. Germinação e preparação do inóculo

As etapas de germinação e preparação de inóculo conforme descrito no item 4.1.2.3 e 4.2.1 foram conduzidas em mesa rotativa com temperatura controlada em 26°C±0,5, e velocidade de agitação de 250 rpm. Foi empregado 1 frasco de 250 mL com 40 mL de meio e 4 mL de suspensão de células para a germinação e incubação por 48 horas.

Para obtenção do inóculo empregou-se 1 frasco de 500 mL com 90 mL de meio e 9 mL de suspensão do germinado e incubação de ±28 horas.

4.2.1.3.2. Fermentação para a biossíntese da CPC

Para a fase de produção de CPC, conforme foi descrito no item 4.1.2.3, foram realizadas fermentações em frascos de 500 mL com 90 mL de meio e 9 mL de suspensão de inóculo por 72 horas. Os meios de cultura utilizados foram mostrados nas tabelas 4.6 e 4.7. A amostragem foi feita de 24 em 24 horas até 72 horas. Os tratamentos das amostras foram realizados segundo descrito no item 4.2.2.

4.2.1.4. Bioprocesso conduzido em biorreator do tipo tanque agitado

4.2.1.4.1. Germinação e obtenção de inóculo

Para os experimentos em biorreator do tipo tanque agitado a germinação e obtenção de inóculo foi conduzida em mesa rotativa com temperatura controlada em 26°C e velocidade de agitação de 250 rpm da mesma maneira que para as fermentações em frascos agitados.

Foi utilizado 1 frasco de 1000 mL contendo 150 mL de volume de meio aproximadamente, para a germinação, mantendo essa operação por 48 horas.

Para a etapa subsequente de obtenção de inóculo foram utilizados dois frascos de 1000 mL, contendo também 150 mL de meio em cada frasco, os quais foram incubados durante 28 horas aproximadamente.

A relação mantida entre volume de inóculo, e volume do frasco e agitação, foi selecionada de modo a garantir o suprimento de oxigênio dissolvido no meio, uma vez que o *C. acremonium* é um fungo estritamente aeróbio.

4.2.1.4.2. Fermentação para a biossíntese da CPC

Para as fermentações foi empregado um biorreator de tanque agitado de 5 litros com controladores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação e dotado de bombas peristálticas que eram usadas para as soluções controladoras de pH, para a realização da alimentação de meio e adição de antiespumante.

A duração das fermentações era de aproximadamente 120 horas, nas seguintes condições:

- Velocidade de agitação controlada entre 300 e 750 rpm.
- Aeração controlada em 1 vvm.
- Oxigênio dissolvido mantido em 40%.
- pH mantido em $6,9 \pm 0,3$ e temperatura em $26^{\circ}\text{C} \pm 0,1$.
- Volume reacional mantido aproximadamente em 3,8 litros.
- Relação de 10% volume de inóculo/volume de meio, mantida em todos os ensaios.
- Adição de pequenos volumes de solução aquosa de antiespumante a 10% apenas quando era observada a formação de espuma.

Para garantir que não haveria limitação pelo oxigênio dissolvido, foi feito o controle no biorreator para a manutenção do nível de 40% de oxigênio dissolvido.

4.2.1.4.3. Operação em batelada alimentada

Na operação semi-contínua, o processo era iniciado com um volume inicial de meio contendo glicose e demais nutrientes, inóculo e antiespumante. O meio suplementar, contendo sacarose, era alimentado ao biorreator à vazão constante, logo após o esgotamento da glicose. As vazões de alimentação do meio suplementar são apresentadas na tabela 4.9.

Tabela 4.9: Condições das operações em batelada alimentada.

ensaio	volume inicial aprox. (mL)	volume suplementado (mL)	início da suplementação (h)	término da suplementação (h)	vazão média da suplementação (mL/min)
A	3000	1000	40	70	0,36
B	3300	1200	41	120	0,24
C	3600	1300	39	106	0,33

4.2.1.4.4. Operação em batelada

Na operação em batelada, o processo era iniciado já com o meio contendo todos os componentes necessários inclusive as duas fontes de carbono.

4.2.1.4.5. Procedimento para a coleta de amostras

A coleta das amostras era feita em ambiente estéril com chama de fogo, por meio do amostrador já existente no fermentador num volume aproximado de 20 mL. Era mantido o frasco coletor sempre estéril. As retiradas de amostras foram feitas no decorrer do processo, em intervalos que variavam de 4 a 6 horas.

As amostras coletadas eram submetidas à medição de pH e tomada do volume em proveta. Em seguida uma alíquota era destinada às determinações da reologia do caldo e à fotomicrografia, e a outra era centrifugada sob refrigeração a 6°C e 3000 rpm para as determinações das concentrações de massa celular, dos açúcares, e de antibiótico. Após a centrifugação, o sobrenadante era armazenado em freezer, para posterior dosagem de açúcares e antibiótico, e o resíduo sólido era tratado para obtenção da massa seca, conforme os métodos analíticos descritos nos itens a seguir.

4.2.2. Métodos Analíticos

4.2.2.1. Determinação de massa seca

A massa celular úmida obtida após a primeira centrifugação, era ressuspendida com ácido acético a 5% vol. para retirada de sais. Em seguida era feita a segunda centrifugação. O sobrenadante era descartado e as células eram levadas para a estufa a 105°C por 18 a 24 horas, em recipientes secos e previamente pesados. A concentração celular era determinada como a massa seca contida no volume de amostra coletado.

4.2.2.2. Determinação de açúcares

4.2.2.2.1. Concentração dos açúcares redutores totais (ART)

A determinação de ART era feita pelo método espectrofotométrico de Somogyi, 1952, após hidrólise ácida de amostra com solução de HCl 0,9 N. Era empregada a proporção de 5:1 em volume de ácido por volume de amostra a 65°C por 30 minutos em banho-maria.

4.2.2.2.2. Concentração dos açúcares redutores (AR)

A determinação de AR era feita também pelo mesmo método de Somogyi, 1952, sem hidrolisar as amostras.

4.2.2.2.3. Concentração de glicose

Determinada pelo método enzimático-colorimétrico GOD-PAP-MERCK.

4.2.2.2.4. Concentração de frutose

Era determinada pela diferença entre as concentrações de AR e de glicose.

4.2.2.2.5. Concentração de sacarose

Era obtida pela diferença entre a concentração de ART e de glicose.

4.2.2.3. Determinação de CPC

A concentração de antibiótico foi determinada através do método de difusão em ágar (Grove e Randall, 1955; Roberts e Boyce, 1972) empregando a linhagem *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 como bactéria teste. O procedimento adotado para essa determinação consistia das seguintes etapas:

- Replique da bactéria em meio sólido nutriente ágar com 0,5 % NaCl, (NA), em tubo de ensaio, à temperatura de 37°C (temperatura ótima para crescimento da bactéria).

- Replique do tubo anterior após 24 horas, empregando 2 mL de solução salina a 0,9% de NaCl em meio sólido (de mesma composição, para erlenmeyer de 250 mL, objetivando ampliação de área superficial para a reprodução bacteriana. Incubação por 24 horas à temperatura de 37°C.

- Adição em ambiente asséptico de 80 mL de solução salina a 0,9% de NaCl no frasco. Era feita a homogeneização e imediatamente era realizada a transferência para frasco vazio previamente esterilizado.

- Leitura em espectrofotômetro a 580 nm, para padronização da concentração da suspensão de bactéria. A suspensão bacteriana padrão deve fornecer uma leitura de aproximadamente 28% de transmitância.

- Adição de 1 mL da suspensão bacteriana padrão em 75 mL de nutriente ágar a 48°C (quando o ágar ainda se mantém fundido), seguida de homogeneização e transferência para as placas de petri esterilizadas com ± 15 cm de diâmetro útil, em ambiente de câmara de fluxo laminar.

- Discos de papel estéreis de 6,0 mm de diâmetro embebidos com soluções padrão de cefalosporina C de 200 e 50 mg/L (em duplicata) e outros embebidos com a solução obtida na fermentação (em duplicata), diluída adequadamente para cada amostragem eram colocados na placa, e deixados em cultivo por 24 horas a 37°C, em estufa. Decorridas as 24 horas as placas de petri apresentavam aparência turva no meio sólido devido ao crescimento bacteriano e próximo aos discos eram observados os halos de inibição provocados pelas soluções de antibióticos difundidos dos discos para o meio. Os halos eram medidos com auxílio de um paquímetro para posterior cálculo da concentração de antibiótico produzido. Para o tamanho de placa de petri empregado, era possível colocar oito discos. As amostras de solução de cefalosporina C, eram feitas em tampão fosfato 6,4. A cefalosporina C padrão foi cedida pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto Catalisis y Petróleo Químico do CSIC, Madrid, Espanha.

4.2.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos e consumo de substrato

Foram feitos ajustes lineares entre C_X-C_{X0} em função de C_S-C_{S0} para cálculo do rendimento Y_{XS} ; $\ln(C_X/C_{X0})$ em função do tempo (h) para o cálculo de velocidade específica de crescimento μ_{max} (Rodrigues, 1992).

4.2.2.5. Acompanhamento das mudanças morfológicas das células

As alterações da morfologia celular, em seus vários estágios de cultivo durante as fermentações, foram acompanhadas por meio do preparo de lâminas para observação em microscópio seguida da fotografia.

4.2.2.6. Caracterização reológica

A metodologia empregada por Schmidell *et al.* (1994), Badino Jr. (1997) e Queiroz *et al.* (1997) em caldos fermentativos de *Aspergillus awamori* foi aplicada para a caracterização dos caldos de cultivo com *C. acremonium* C-10 no presente trabalho.

4.2.2.6.1. Calibração dos cilindros

Para a calibração dos conjuntos de cilindros 21/13R e 15/7R, foi usado o Viscosímetro modelo RVT Brookfield, usando fluido de viscosidade padrão igual a 1000 cp (centipoise), à temperatura constante. Às determinações experimentais de (τ) em função de (% torque) aplicou-se uma regressão linear, para obtenção do coeficiente de proporcionalidade k' definido pela equação 4.1. Os valores do coeficiente k'' da equação 4.2 foram obtidos do manual de especificações do viscosímetro. Para a calibração do adaptador “ultra low” foi empregada a própria água como fluido padrão. O adaptador “ultra low” possui o espaço anular bem menor que os apresentados pelos outros conjuntos de cilindros empregados.

$$\tau = k' \cdot T \quad (4.1)$$

$$\gamma = k'' \cdot N \quad (4.2)$$

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (4.3)$$

Tabela 4.10: Constantes de proporcionalidade k' e k'' , das equações 4.1 e 4.2

	UL-adapter	21/13R	15/7R
k'	0,01068	0,0648	0,3287
k''	1,22	0,93	0,48

4.2.2.6.2. Determinações experimentais para a caracterização reológica e cálculo da viscosidade aparente

Para a caracterização reológica dos caldos empregou-se viscosímetro Brookfield modelo LVT com os 3 conjuntos de cilindros concêntricos citados anteriormente. As determinações experimentais de percentagem de torque (%T) em função de velocidade de rotação do eixo do cilindro interno (N), foram realizadas com as amostras de caldos coletadas durante as fermentações em banho maria com temperatura controlada em 26°C. Os volumes das amostras usadas para essas determinações era de 8 mL para o 21/13R, 3,3 mL para o 15/7R, e de 16 mL para o adaptador “ultra low”.

A taxa de cisalhamento (τ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), foram calculadas com as equações 4.1 e 4.2, empregando as constantes de proporcionalidade apresentadas na tabela 4.10.

Para a obtenção dos parâmetros índice de escoamento (n), e índice de consistência (K) da equação 4.3, conhecida como lei da Potência, foram aplicadas regressões não-lineares aos pares calculados de taxa de cisalhamento (τ) em função de taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para cada amostra.

As velocidades de rotação do eixo do agitador do fermentador foram registradas durante as amostragens.

A viscosidade aparente (μ_{ap}), no biorreator, foi calculada usando as equações 4.2 e 4.3 combinadas, conforme mostrado na equação 4.4.

$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{K \cdot \dot{\gamma}^n}{\dot{\gamma}} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (4.4)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas várias fermentações, com as quais buscou-se determinar a melhor composição de açúcares no meio de fermentação, baseada na produtividade específica de CPC obtida em cada situação.

São também apresentados os resultados obtidos com os processos conduzidos em biorreator do tipo tanque agitado, em batelada e batelada alimentada, e a comparação entre eles, incluindo os resultados obtidos nas fermentações em frascos agitados. Para finalizar, são apresentados os resultados da caracterização reológica do caldo de fermentação e a sua associação com a morfologia celular, ao longo do processo.

5.1. Fermentações realizadas em frascos agitados

Nas fermentações em frascos agitados conduzidos conforme os procedimentos experimentais do item 4.2.1.3 foram obtidos os resultados que estão mostrados na tabela 5.1.

A discussão foi feita partindo-se dos resultados que forneceram maiores produtividades específicas nos três conjuntos de experimentos, germinação em glicose, em sacarose e na mistura de sacarose e glicose. Na seqüência, foi realizada a discussão da produtividade específica alcançada em cada conjunto de experimentos onde foram variadas as condições dos açúcares na fase da produção de CPC.

Tabela 5.1: Resultados das fermentações em frascos agitados realizadas com diversas combinações dos açúcares glicose (G), frutose (F) e sacarose (S), após 72 horas de processo. (Concentração inicial do meio de cultura, vide tabela 4.7).

ensaio	condição (*)	pH	C _x (g/L)	glicose residual (g/L)	frutose residual (g/L)	sacarose residual (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{ca} .h)
11	G→G	6,0	29,5	7,1	-	-	133	0,064
12	G→S	6,5	22,1	1,1	2,4	19,3	124	0,081
13	G→GF	5,8	28,3	3,4	3,4	-	130	0,066
14	G→GS	5,8	24,2	1,0	-	14,3	304	0,180
15	G→F	6,2	29,7	-	10,2	-	145	0,070
21	S→G	6,1	27,6	12,2	-	1,1	66	0,034
22	S→S	7,7	10,7	0,6	1,7	46,9	32	0,043
23	S→GF	6,2	25,3	0,3	14,9	0,2	64	0,036
24	S→GS	6,3	23,0	1,1	-	9,5	111	0,068
25	S→F	6,4	26,2	-	12,9	0,8	140	0,074
31	GF→G	5,8	30,3	5,4	1,9	-	129	0,060
32	GF→S	6,2	19,5	0,2	0,5	28,5	148	0,110
33	GF→GF	5,8	27,1	-	2,8	-	132	0,070
34	GF→GS	5,8	21,4	0,6	-	19,9	264	0,137
35	GF→F	6,0	28,0	-	9,5	-	193	0,099

* À direita, condição da germinação e obtenção do inóculo. À esquerda condição da fase de produção de CPC. Os números da coluna ensaio representam 1 (glicose); 2 (sacarose); 3 (glicose+frutose); 4 (glicose+sacarose) e 5 (frutose).

5.1.1. Resultados obtidos nos ensaios 14, 24 e 34

Pelos resultados mostrados na tabela 5.1, pode-se observar que entre todas as combinações empregadas de açúcares para a duas etapas envolvidas na fermentação (obtenção de inóculo e produção de antibiótico), as produtividades específicas apresentaram os maiores valores nos ensaios 14, 24 e 34.

As condições empregadas para estes ensaios podem ser observadas na seção 4.1.2.3, tabelas 4.3 a 4.7.

Para o ensaio 14 foi empregada glicose na fase de obtenção do inóculo. Para o ensaio 34 foi empregada uma mistura de glicose e frutose na fase do inóculo e para o ensaio 24 foi utilizada sacarose para a obtenção do inóculo. Na 2.^a etapa da fermentação (fase de biossíntese do antibiótico) não houve alteração na composição do meio nutriente, foi mantida em todos os três ensaios a mistura de glicose e sacarose. Pelas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 observa-se o comportamento da produtividade, e pelas figuras 5.4, 5.5 e 5.6 o do crescimento celular. Tendo atingido os valores mencionados a seguir:

$$\begin{array}{ll} Pr_{\text{esp}14} = 0,180 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h} & \text{massa seca}_{14} = 24,2 \text{ g/L} \\ Pr_{\text{esp}34} = 0,137 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h} & \text{massa seca}_{24} = 23,0 \text{ g/L} \\ Pr_{\text{esp}24} = 0,068 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h} & \text{massa seca}_{34} = 21,4 \text{ g/L} \end{array}$$

Comparando-se a produtividade específica e massa celular verifica-se que houve uma inversão na ordem entre os ensaios 24 e 34, apesar de poder ser considerado que os três valores são muito próximos. A partir disso, pode-se inferir que a produtividade específica não está diretamente relacionada com o crescimento celular, confirmando o descrito na literatura (Matsumura *et al.*, 1978; Demain *et al.*, 1963; Araujo *et al.*, 1993).

A literatura apresenta resultados de crescimento do *C. acremonium* em várias fontes de carbono, mas o que se verifica é que o fungo cresce melhor na glicose (Matsumura *et al.*, 1978; Demain, 1984; Demain e Kennel, 1978), o que foi confirmado no presente trabalho.

As figuras 5.4 e 5.6 mostram que o crescimento celular apresentou resultado muito semelhante, apesar de ter sido inferior para o caso do ensaio 34.

Pelas tabelas 5.5, 5.10 e 5.15 e figuras 5.7, 5.8 e 5.9, observa-se que o consumo de glicose para os ensaios 14 e 34 foram muito semelhantes (cerca de 3 g/L

por volta das 48 horas), enquanto que para o ensaio 24 em 48 horas ainda havia 10 g/L de glicose.

Considerando-se que para estes ensaios a diferença foi residu nos diferentes açúcares empregados para a obtenção do inóculo, é interessante salientar que no ensaio 14 usou-se 20 g/L de glicose enquanto que no ensaio 34 usou-se uma mistura 10 g/L de glicose e 10 g/L de frutose.

Na dosagem de frutose do ensaio 34 foram verificados apenas traços, significando que a frutose foi consumida juntamente com a glicose na etapa anterior de preparação de inóculo.

Sobre a sacarose, as figuras 5.10, 5.11 e 5.12 mostram que esta só começou a ser consumida por volta de 48 horas, tempo em que a glicose já havia sido praticamente esgotada. Este fato confirmou o comportamento diáuxico do *C. acremonium* descrito por Shen *et al.* (1986).

O comportamento do pH foi muito semelhante para os ensaios (figuras de 5.13 a 5.15).

5.1.2. Resultados obtidos nos ensaios 11, 12, 13, 14 e 15

As tabelas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 mostram os resultados obtidos para estes ensaios, cujas condições do meio são apresentadas nas tabelas 4.3 a 4.7.

Quanto à produtividade específica e crescimento celular, as figuras 5.1 e 5.4 e as tabelas 5.2 a 5.6 apresentam os seguintes resultados:

$Pr_{esp14} = 0,180 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél.} \cdot h$	massa seca ₁₄ = 24,2 g/L
$Pr_{esp12} = 0,081 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél.} \cdot h$	massa seca ₁₂ = 22,1 g/L
$Pr_{esp15} = 0,070 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél.} \cdot h$	massa seca ₁₅ = 29,7 g/L
$Pr_{esp13} = 0,066 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél.} \cdot h$	massa seca ₁₃ = 28,3 g/L
$Pr_{esp11} = 0,064 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél.} \cdot h$	massa seca ₁₁ = 29,5 g/L

onde pode ser constatado que o ensaio 14 forneceu resultado superior. Neste caso o meio para a biossíntese da cefalosporina C continha glicose e sacarose. O segundo maior valor obtido para a produtividade específica foi com o ensaio 12, que continha

apenas sacarose. O terceiro maior valor, caso do ensaio 15, continha apenas frutose no meio. Os dois ensaios restantes continham frutose+glicose e glicose respectivamente, e apresentaram valores muito próximos. O ensaio 13 apresentou um resultado ligeiramente superior.

Como já comentado na revisão bibliográfica, o *C. acremonium* exigir preferencialmente, a mistura de glicose e sacarose na relação de 27:36 na fase de produção de antibiótico em ensaios em batelada.

Estes resultados quando comparados com os da produtividade específica novamente confirmam que a concentração celular não está diretamente relacionada com a produção de cefalosporina C.

As maiores concentrações de massa celular ocorreram com os açúcares de fácil assimilação pelo microrganismo: glicose, frutose, e glicose+frutose, e portanto indicados para a primeira fase da fermentação de preparação do inóculo. Segundo a literatura o açúcar de lenta assimilação (sacarose) é preferido pelo microrganismo para a fase da biossíntese do antibiótico.

As figuras 5.7, 5.16 e 5.10 e as tabelas de 5.2 a 5.6 apresentam o consumo da glicose, frutose e sacarose (respectivamente), e pode-se observar que para o tempo de 48 horas obteve-se as seguintes concentrações:

glicose ₁₁ = 37,6 g/L	-	-
-	frutose ₁₅ = 34,1 g/L	-
-	frutose ₁₃ = 24,3 g/L	-
glicose ₁₂ = 4,7 g/L	frutose ₁₂ = 4,1 g/L	sacarose ₁₂ = 4,5 g/L
glicose ₁₄ = 3,5 g/L	-	sacarose ₁₄ = 31,1 g/L

Pelos dados mostrados em 48 horas de fermentação, nas figuras 5.7 e 5.16 verifica-se que nos ensaios 11, 13 e 15 as concentrações de glicose e/ou frutose ainda permaneceram altas. Para os ensaios 14 e 12 ocorreu o esgotamento da glicose que propiciou o aparecimento das enzimas que sintetizam a cefalosporina C, e isto foi comprovado pela produtividade específica alcançada. Isto confirma que as enzimas

responsáveis pela formação da cefalosporina C começam a atuar próximo ao esgotamento da glicose ou de outro açúcar de rápida assimilação.

A sacarose teve o início de seu consumo após o esgotamento da glicose por volta das 48 horas como pode ser visto na figura 5.10.

Quanto às determinações do pH, foi observado um comportamento semelhante para todos os ensaios exceto para o ensaio 12, que apresentou uma variação com amplitude maior que os demais (figura 5.13).

5.1.3. Resultados obtidos nos ensaios 21 a 25

De acordo com as tabelas 5.1 e de 5.7 a 5.11, a condição empregada de sacarose na fase de germinação e preparo de inóculo, prejudicou os resultados. Como já mencionado nos itens 5.1.1 e 5.1.2, o *C. acremonium* apresenta preferência pela glicose para a fase de germinação e preparo de inóculo e para a fase de formação do antibiótico a exigência é com açúcares de lenta assimilação. Demain *et al.* (1963) verificou que para esta fase a mistura de 27:36 de glicose/sacarose era a mais adequada.

Os resultados de produtividade específica e massa seca podem ser observados a seguir:

$Pr_{esp25} = 0,074 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél}.h$	massa seca ₂₁ = 27,5 g/L
$Pr_{esp24} = 0,068 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél}.h$	massa seca ₂₅ = 26,2 g/L
$Pr_{esp22} = 0,043 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél}.h$	massa seca ₂₃ = 25,3 g/L
$Pr_{esp23} = 0,036 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél}.h$	massa seca ₂₄ = 23,0 g/L
$Pr_{esp21} = 0,034 \text{ mg}_{CPC}/g_{cél}.h$	massa seca ₂₂ = 10,7 g/L

Os resultados apresentados confirmam a atuação dos açúcares. A glicose, a mistura de glicose e frutose e a frutose são mais adequadas ao crescimento do microrganismo e inibem e reprimem a formação das enzimas β -lactâmicas que sintetizam o antibiótico, enquanto que a sacarose e mistura de glicose e sacarose atuam principalmente na fase de formação do antibiótico.

Com relação ao valor das produtividades específicas atingidas nos ensaios 21, 22, 23, 24 e 25, pelas justificativas comentadas de literatura e pelos resultados já obtidos, esperava-se que as produtividades ocorrecem de acordo com as afinidades pelos açúcares para a produção de CPC:

$$Pr_{\text{esp}24} > Pr_{\text{esp}22} > Pr_{\text{esp}25} > Pr_{\text{esp}23} > Pr_{\text{esp}21}$$

uma vez que a presença de glicose e sacarose na proporção 27:36 na segunda etapa da fermentação produziu produtividade superior de CPC. Porém, como foi empregada a sacarose no meio de cultura para a fase do crescimento celular, fase de preparação de inóculo, a condição 25 (sacarose→frutose) proporcionou uma maior produtividade específica. Na verdade para os ensaios 24 e 25, os resultados foram muito próximos, a pequena diferença de $\pm 8\%$ entre um e outro pode ser atribuída a possíveis erros ou imprecisões dos métodos analíticos para cálculo da concentração da sacarose. Além disso, o fato do inóculo ter sido preparado em meio com sacarose, fica difícil afirmar as condições em que a linhagem se encontrava para receber um meio novo com objetivo de produzir antibiótico. Isto pode ser visto comparando as produtividades no ensaio 14 (glicose→glicose+sacarose (27:36)) e 24 (sacarose→glicose+sacarose (27:36)), que deu uma diferença de 62% aproximadamente.

Quanto às concentrações de massa seca obtidas, houve concordância com os resultados anteriores e com a literatura. A linhagem mostra preferência para crescer na glicose. As figuras 5.2, 5.5, 5.8, 5.11 e 5.17 mostram todos os resultados obtidos dos ensaios 21 a 25.

Se relacionarmos o consumo de glicose, frutose e sacarose apresentados nas figuras 5.8, 5.17 e 5.11 com a produtividade específica e massa celular nas 48 horas de fermentação, verificamos novamente fatos ocorridos e já discutidos anteriormente.

O ensaio 24 apresentou baixa concentração de glicose quando comparado aos ensaios 23 e 21 nas 48 horas, enquanto a sacarose para o ensaio 24 apresentou um decaimento a partir das 48 horas. As concentrações de sacarose nos ensaios 21, 23 e

25 detectados eram provenientes da etapa de preparo de inóculo, isto é, traços. No ensaio 22 a frutose detectada como traços deve ter sido proveniente da hidrólise da sacarose realizada pelo próprio microrganismo. Nos ensaios 23 e 25, em que foi empregada a frutose no meio, pode ser observado que em 48 horas, apesar da concentração ainda ser alta, foi o momento em que iniciou o consumo de frutose com maior velocidade, fase em que ocorreu a produção da cefalosporina C.

Os pHs para estes ensaios permaneceram muito semelhantes, sendo que para o ensaio 22 o pH tendeu a subir. As concentrações de frutose, glicose e sacarose são mostradas a seguir.

glicose ₂₅ = -	frutose ₂₅ = 49,9 g/L	sacarose ₂₅ = 3,0 g/L
glicose ₂₄ = 10,0 g/L	-	sacarose ₂₄ = 35,4 g/L
glicose ₂₂ = 1,1 g/L	frutose ₂₂ = 0,9 g/L	sacarose ₂₂ = 43,5 g/L
glicose ₂₃ = 37,0 g/L	frutose ₂₃ = 28,3 g/L	sacarose ₂₃ = 6,5 g/L
glicose ₂₁ = 42,1 g/L	-	sacarose ₂₁ = 1,6 g/L

5.1.4. Resultados obtidos nos ensaios de 31 a 35

Como já foi comentado, as exigências do *C. acremonium* a respeito da utilização de açúcares para crescimento e para produção de antibiótico, era esperado que para este conjunto de ensaios, onde a condição inicial para a fase do inóculo foi utilizada a mistura de glicose e frutose, que os resultados fossem intermediários, isto é, inferiores ao conjunto de 11 a 15 e superiores ao conjunto de 21 a 25, por que a condição de açúcar no inóculo nos ensaios de 11 a 15 era glicose, e nos ensaios 21 a 25 era sacarose.

Para isto as tabelas 5.12 e 5.16 e figuras 5.3, 5.6, 5.9, 5.12, 5.15 e 5.18 devem ser observadas, para uma análise comparativa com os demais ensaios já discutidos. A seguir são mostrados os resultados de produtividade específica e crescimento celular para os referidos ensaios.

$Pr_{\text{esp34}} = 0,137 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$	massa seca ₃₁ = 30,3 g/L
$Pr_{\text{esp32}} = 0,110 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$	massa seca ₃₅ = 28,0 g/L
$Pr_{\text{esp35}} = 0,099 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$	massa seca ₃₃ = 27,1 g/L
$Pr_{\text{esp33}} = 0,070 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$	massa seca ₃₄ = 21,4 g/L
$Pr_{\text{esp31}} = 0,060 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$	massa seca ₃₂ = 19,5 g/L

Estes resultados estão coerentes com as discussões feitas anteriormente. Os meios que continham mistura de glicose e sacarose ou sacarose pura favoreceram a produção de antibiótico.

Quanto às concentrações de glicose, frutose e sacarose presentes no meio nas 48 horas de cultivo, pode ser visto que estão também coerentes:

glicose ₃₄ = 2,6 g/L	frutose ₃₄ = 1,1 g/L	sacarose ₃₄ = 32,7 g/L
glicose ₃₂ = 1,3 g/L	frutose ₃₂ = 0,6 g/L	sacarose ₃₂ = 46,2 g/L
-	frutose ₃₅ = 32,4 g/L	-
glicose ₃₃ = 0,1 g/L	frutose ₃₃ = 29,0 g/L	-
glicose ₃₁ = 32,3 g/L	frutose ₃₁ = 1,9 g/L	-

O comportamento diaúxico do microrganismo pode novamente ser observado principalmente nos ensaios 33 e 34 pelas figuras 5.9 e 5.12, a partir das 48 horas ocorreu o esgotamento da glicose para iniciar a formação de cefalosporina C. A figura 5.12 apresenta a curva de consumo da sacarose para os ensaios 32 e 34. Em ambos os ensaios observou-se que a sacarose só começou a ser consumida a partir das 48 horas para iniciar a produção de cefalosporina.

Os resultados do ensaio 35 (glicose+frutose→frutose) pelas tabela 5.16 e figura 5.18 mostram que em 48 horas de fermentação a frutose já havia sido consumida em aproximadamente 40% de seu valor inicial, na ausência de glicose, o *C. acremonium* utiliza a frutose e a diauxia também ocorre.

Os resultados do ensaio 31 (glicose+frutose→glicose) em função dos açúcares empregados e pela discussão anterior atingiu produtividade específica menor dentro deste conjunto de ensaios.

Comparando, finalmente, as produtividades específicas obtidas nos três conjuntos de ensaios, concluímos que os resultados foram coerentes, como pode ser visto logo a seguir:

$$Pr_{esp14} > Pr_{esp34} > Pr_{esp24}$$

$$Pr_{esp12} > Pr_{esp32} > Pr_{esp22}$$

$$Pr_{esp15} > Pr_{esp35} > Pr_{esp25}$$

$$Pr_{esp13} > Pr_{esp33} > Pr_{esp23}$$

$$Pr_{esp11} > Pr_{esp31} > Pr_{esp21}$$

$$Pr_{esp14} > Pr_{esp32} > Pr_{esp35} > Pr_{esp33} > Pr_{esp11}$$

É interessante salientar que a condição do ensaio 14 (glicose→glicose+sacarose (27:36)) é a condição discutida na literatura como padrão, e forneceu valor superior a todos as outras condições testadas. Quanto aos valores das produtividades dos ensaios 32, 35 e 33 terem sido superiores aos dos ensaios 12, 15 e 13, respectivamente, parece que a repressão catabólica nos ensaios 32, 35 e 33 foi menor que a repressão catabólica nos ensaios 12, 15 e 13.

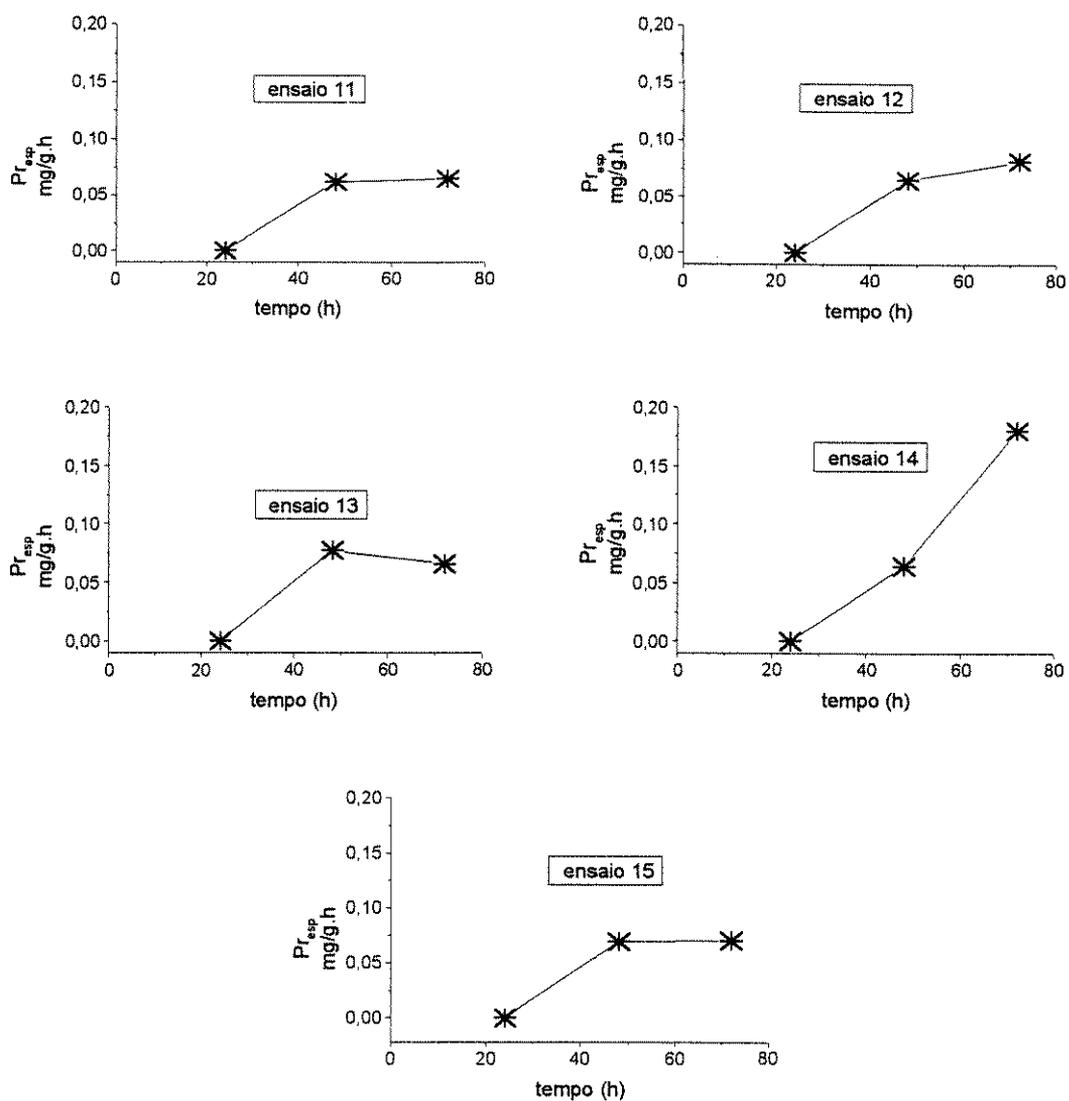


Figura 5.1: Resultados da produtividade específica alcançada nos experimentos realizados em frascos agitados. Ensaio 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F).

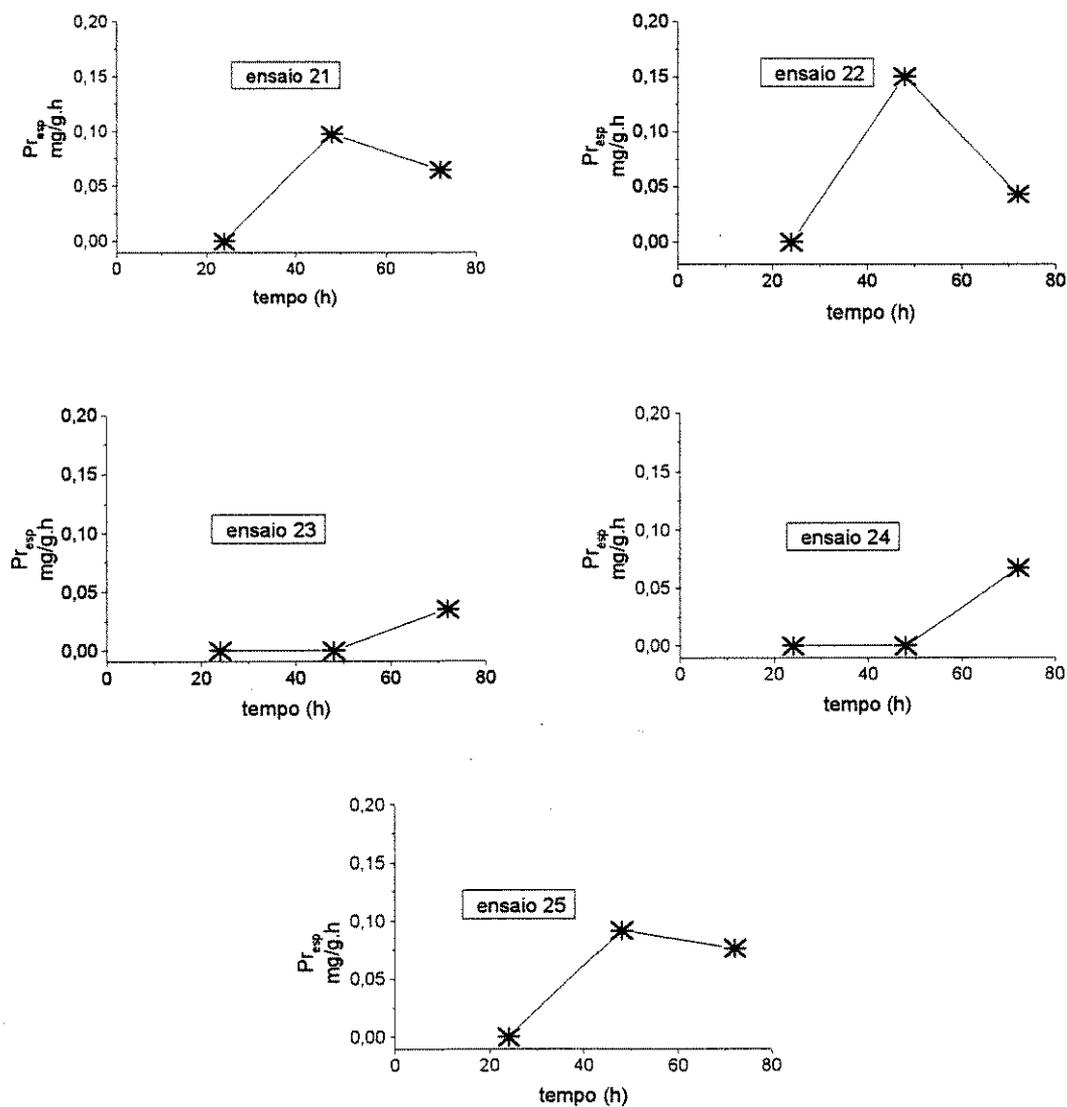


Figura 5.2: Resultados da produtividade específica alcançada nos experimentos realizados em frascos agitados. O meio de germinação continha sacarose. Ensaio 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).

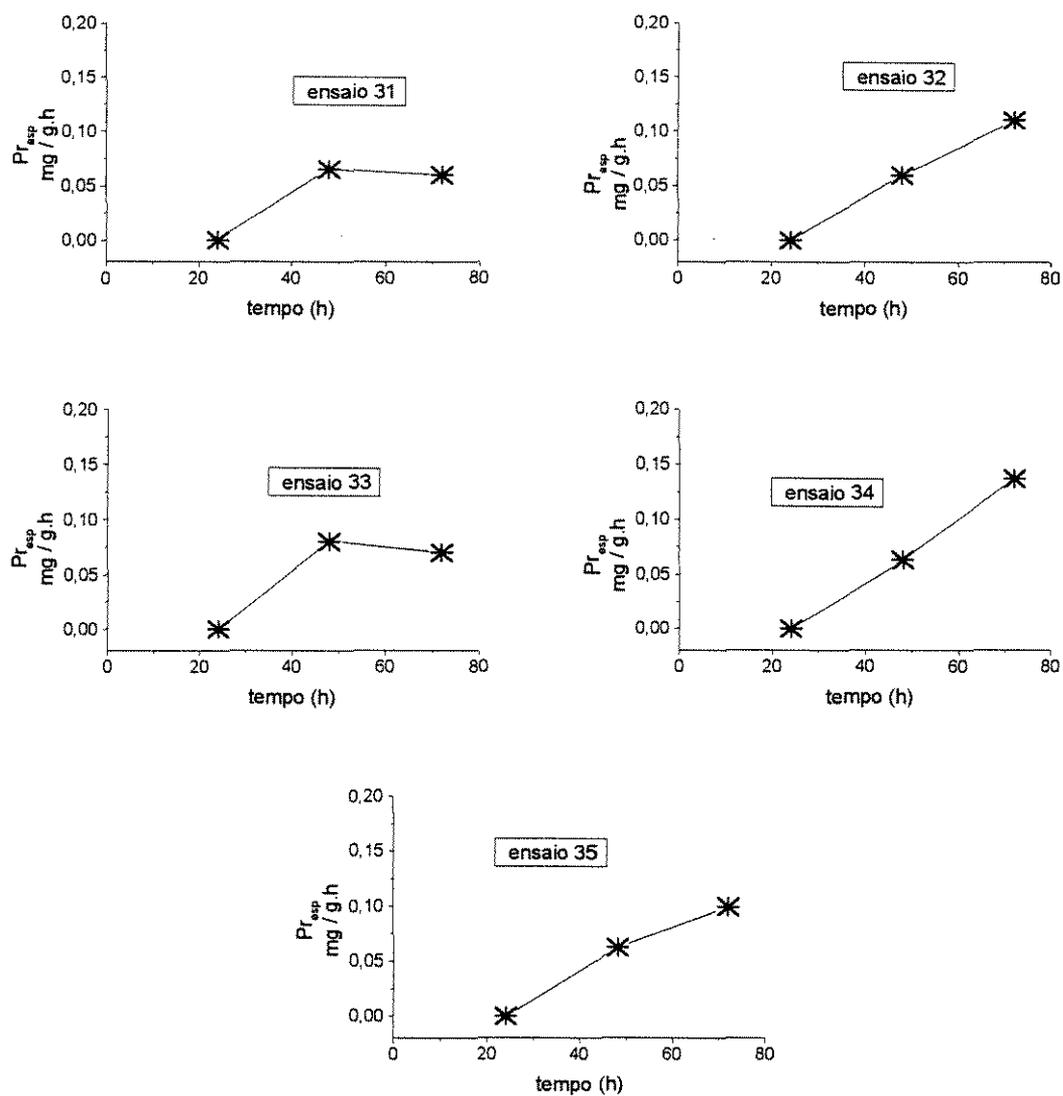


Figura 5.3: Produtividade específica atingida nos experimentos realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).

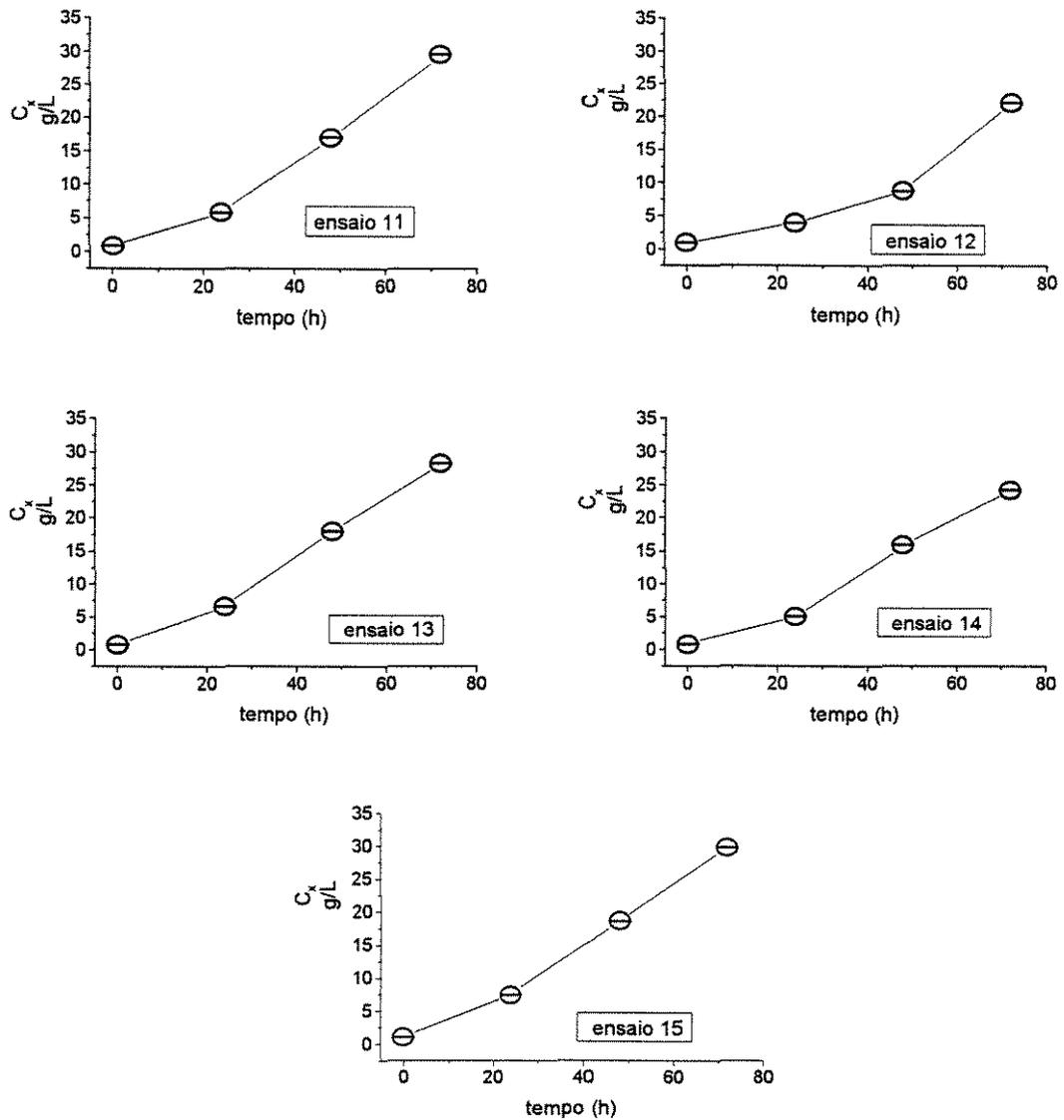


Figura 5.4: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F).

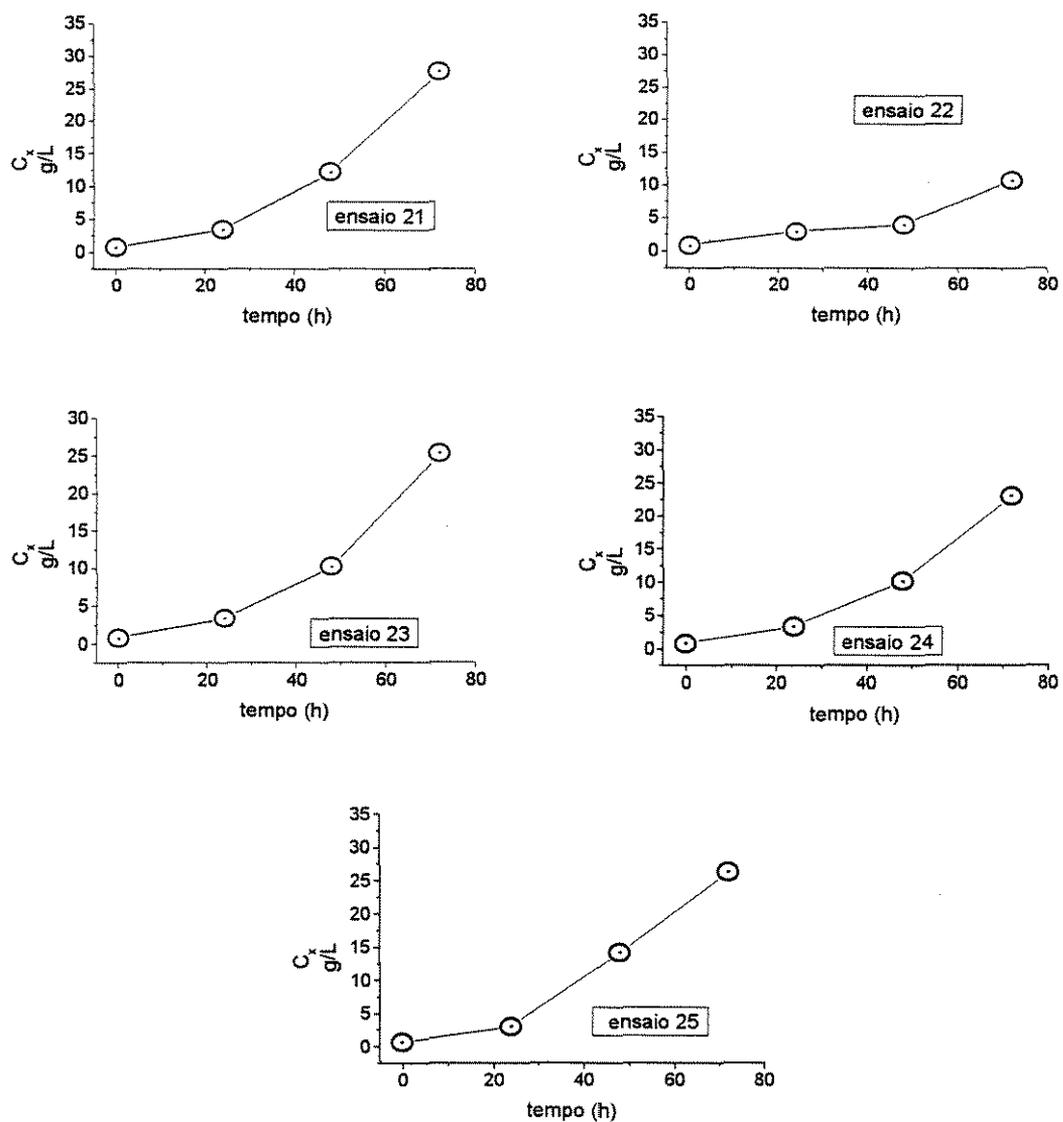


Figura 5.5: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).

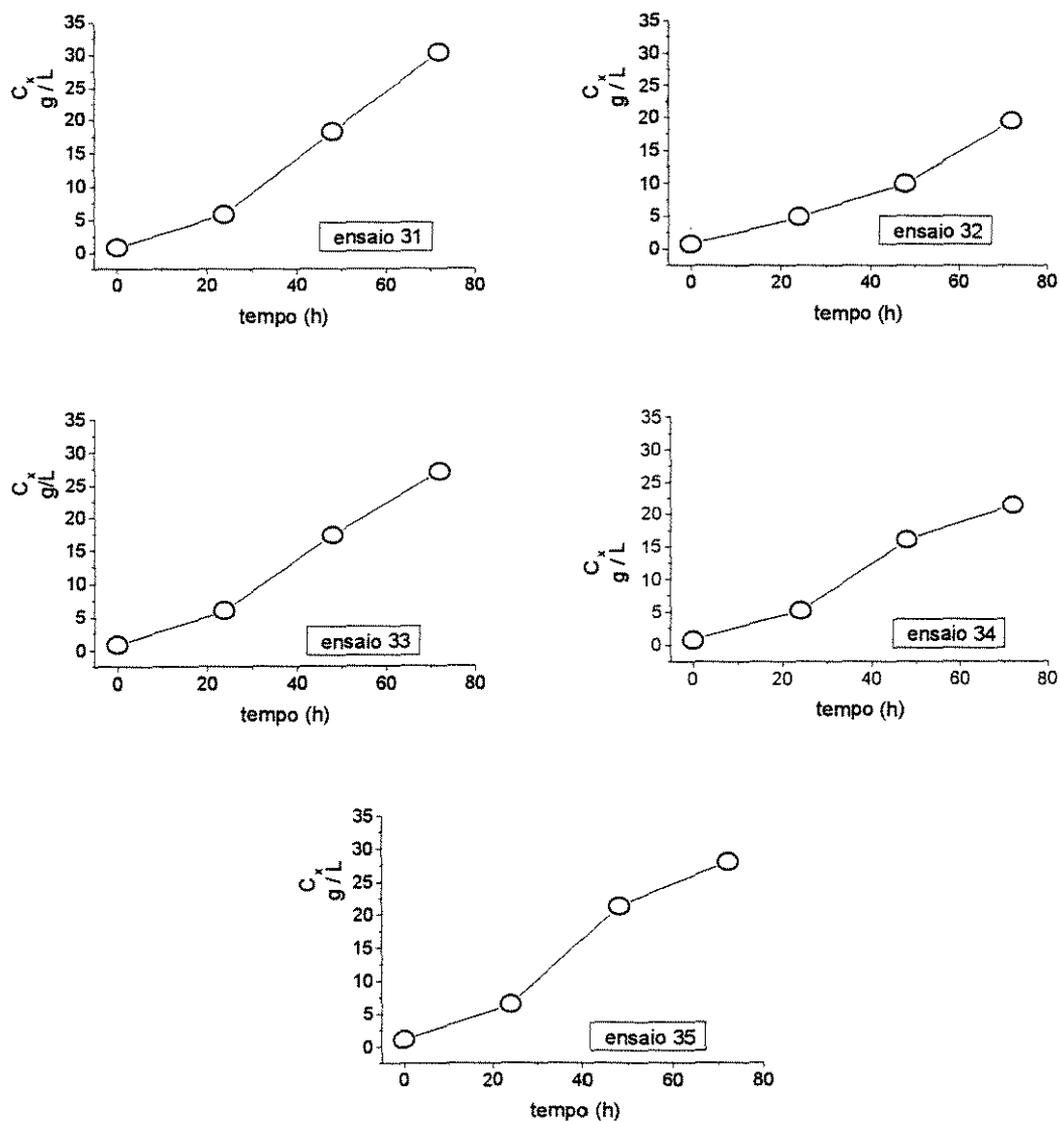


Figura 5.6: Concentração de massa seca obtida em ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).

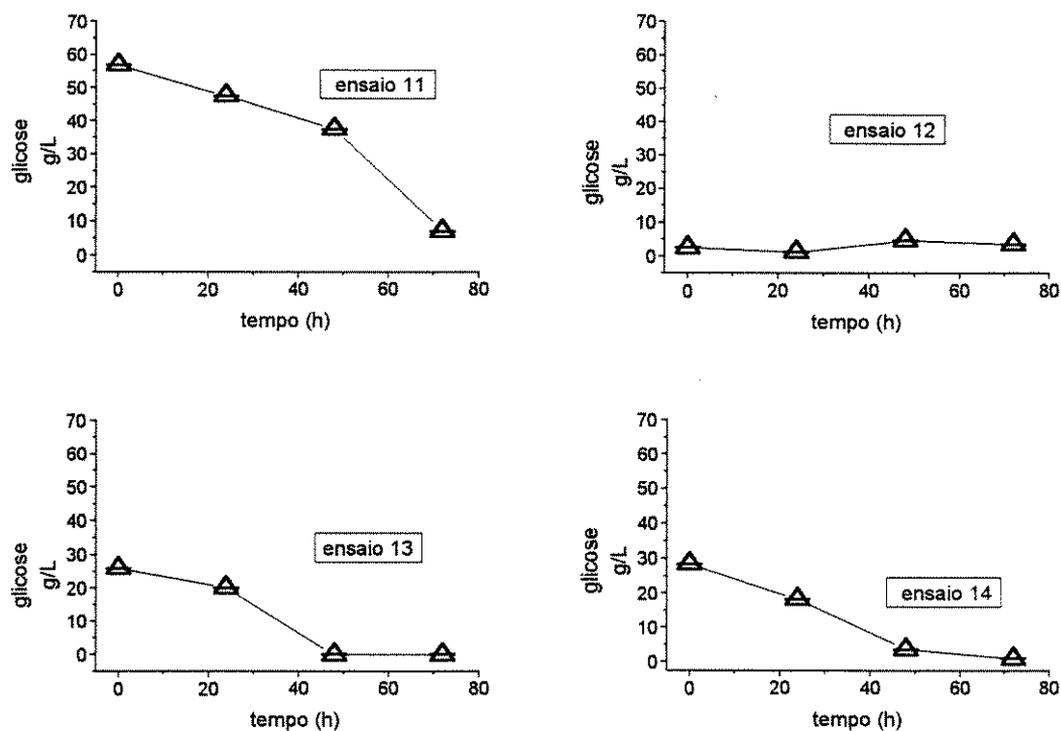


Figura 5.7: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF) e 14 (G-GS).

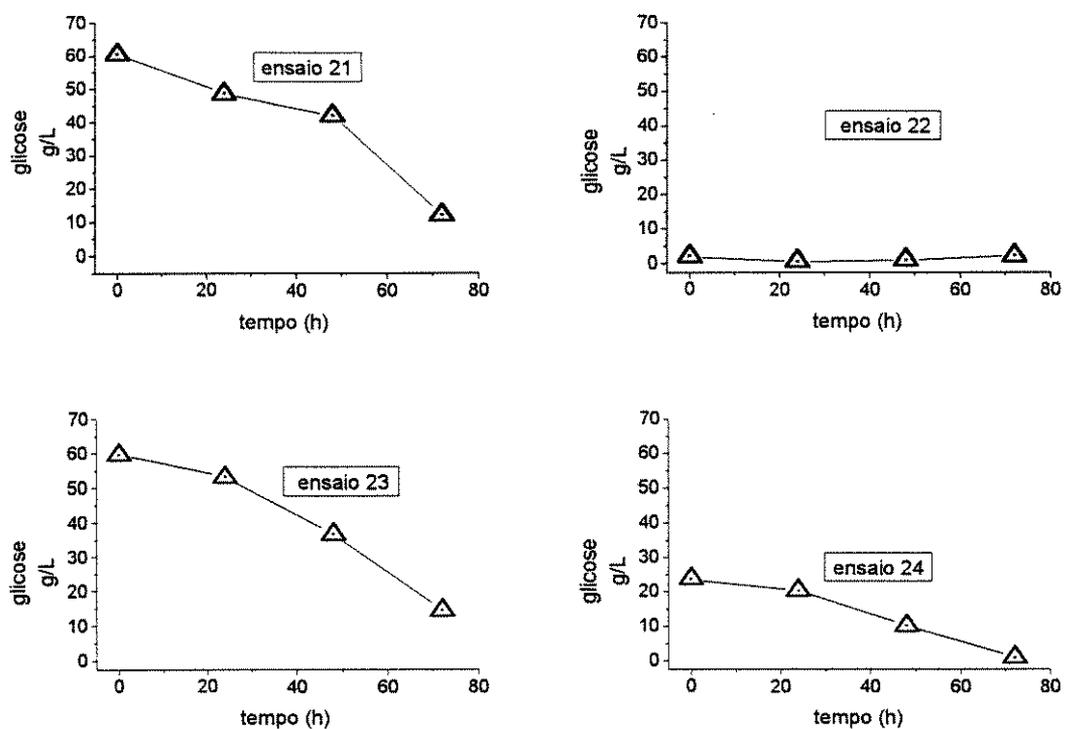


Figura 5.8: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF) e 24 (S-GS).

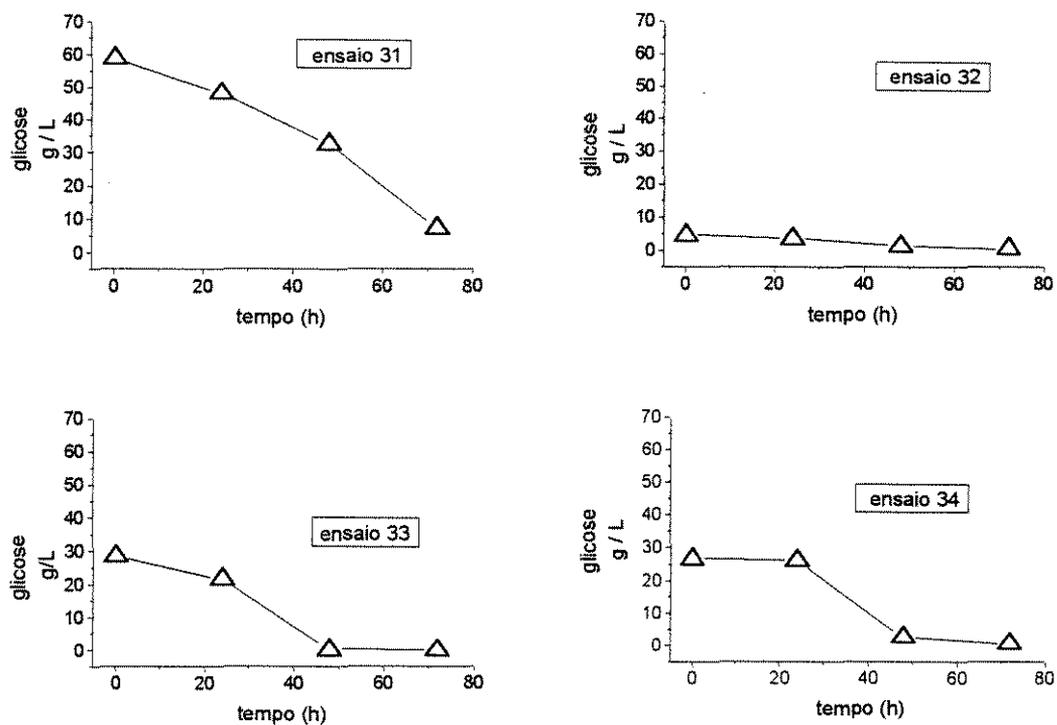


Figura 5.9: Concentração de glicose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF) e 34 (GF-GS).

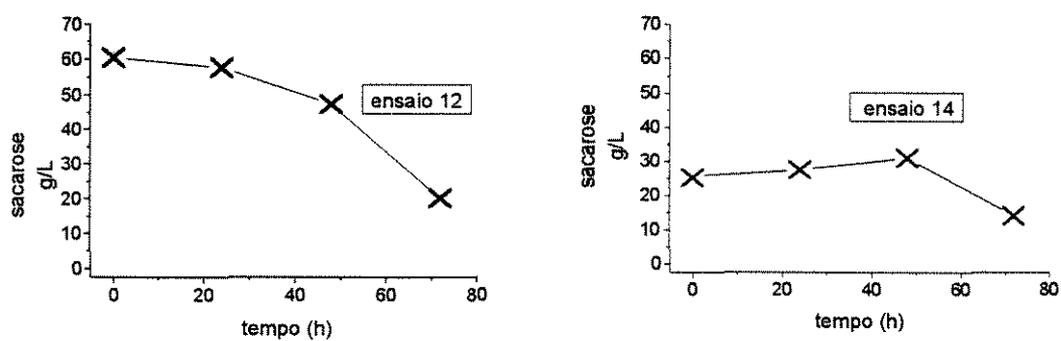


Figura 5.10: Concentração de sacarose medida durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 12 (G-S) e 14 (G-GS).

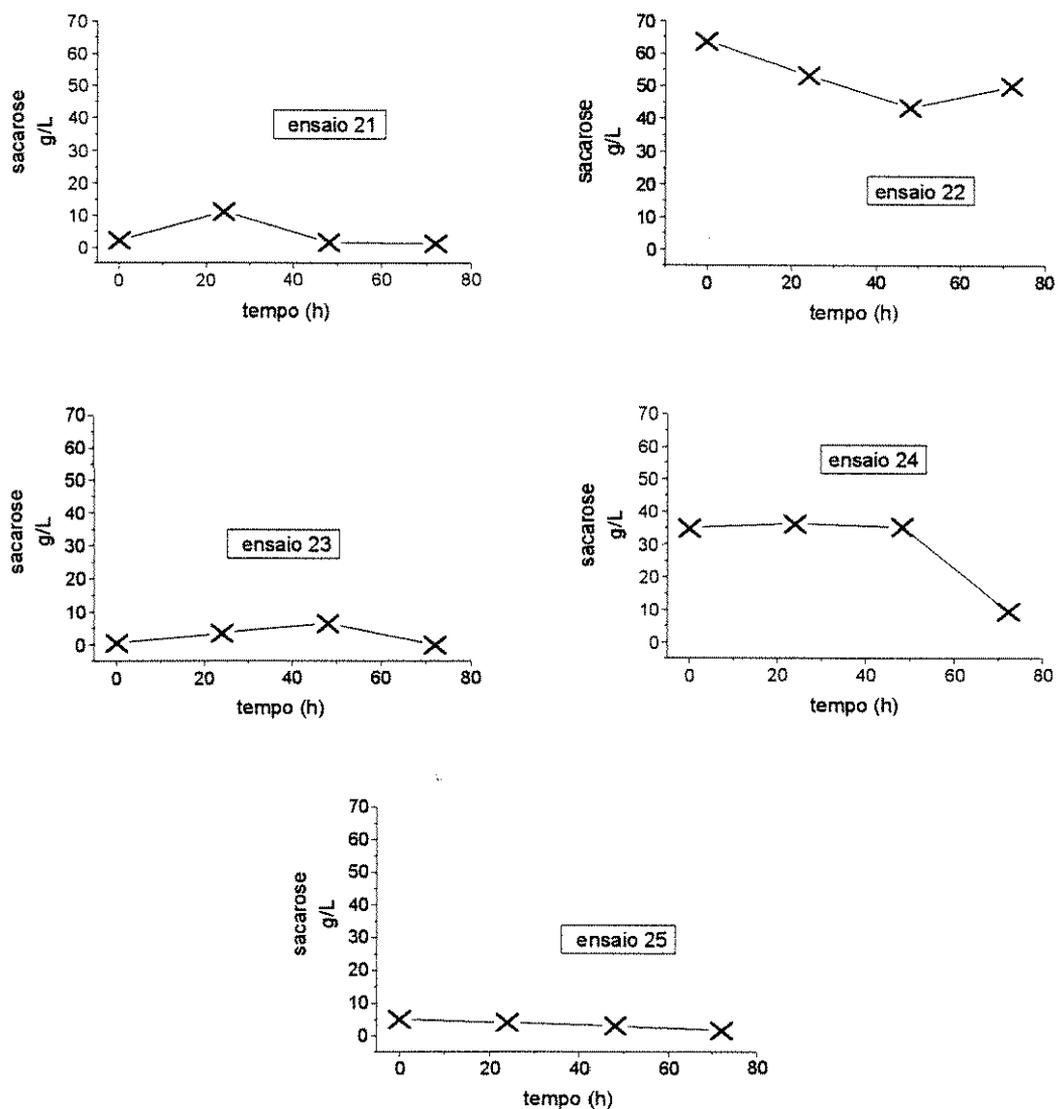


Figura 5.11: Concentração de sacarose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaios 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).

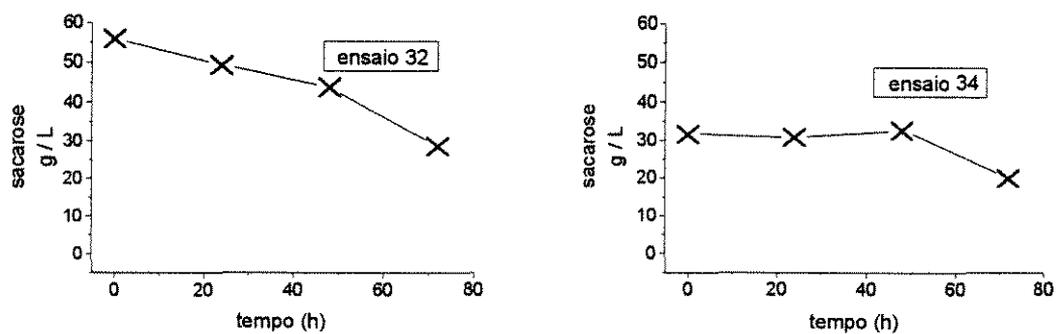


Figura 5.12: Concentração de sacarose medida durante os ensaios de frascos agitados. Ensaios 32 (GF-S) e 34 (GF-GS).

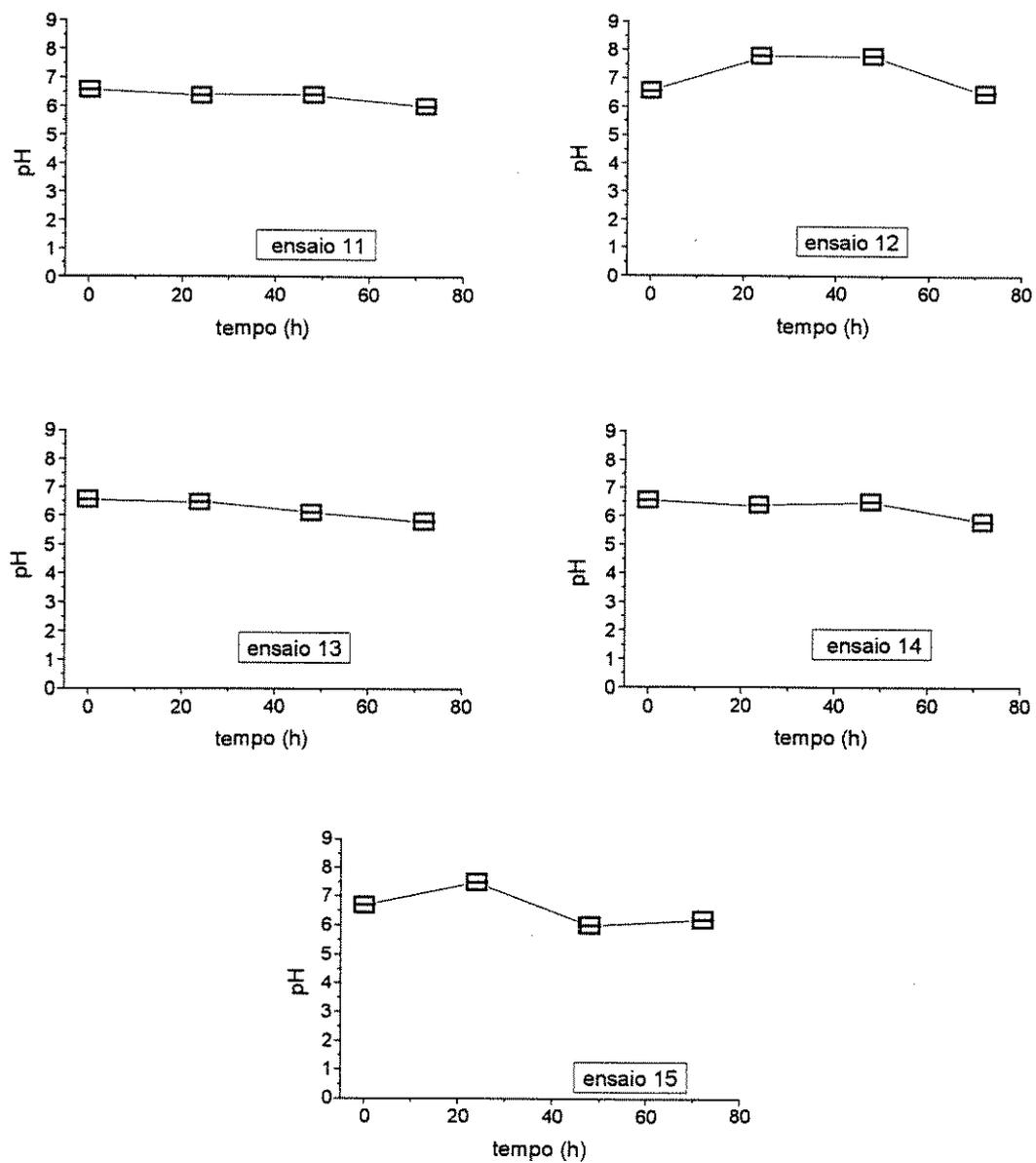


Figura 5.13: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaio 11 (G-G), 12 (G-S), 13 (G-GF), 14 (G-GS) e 15 (G-F).

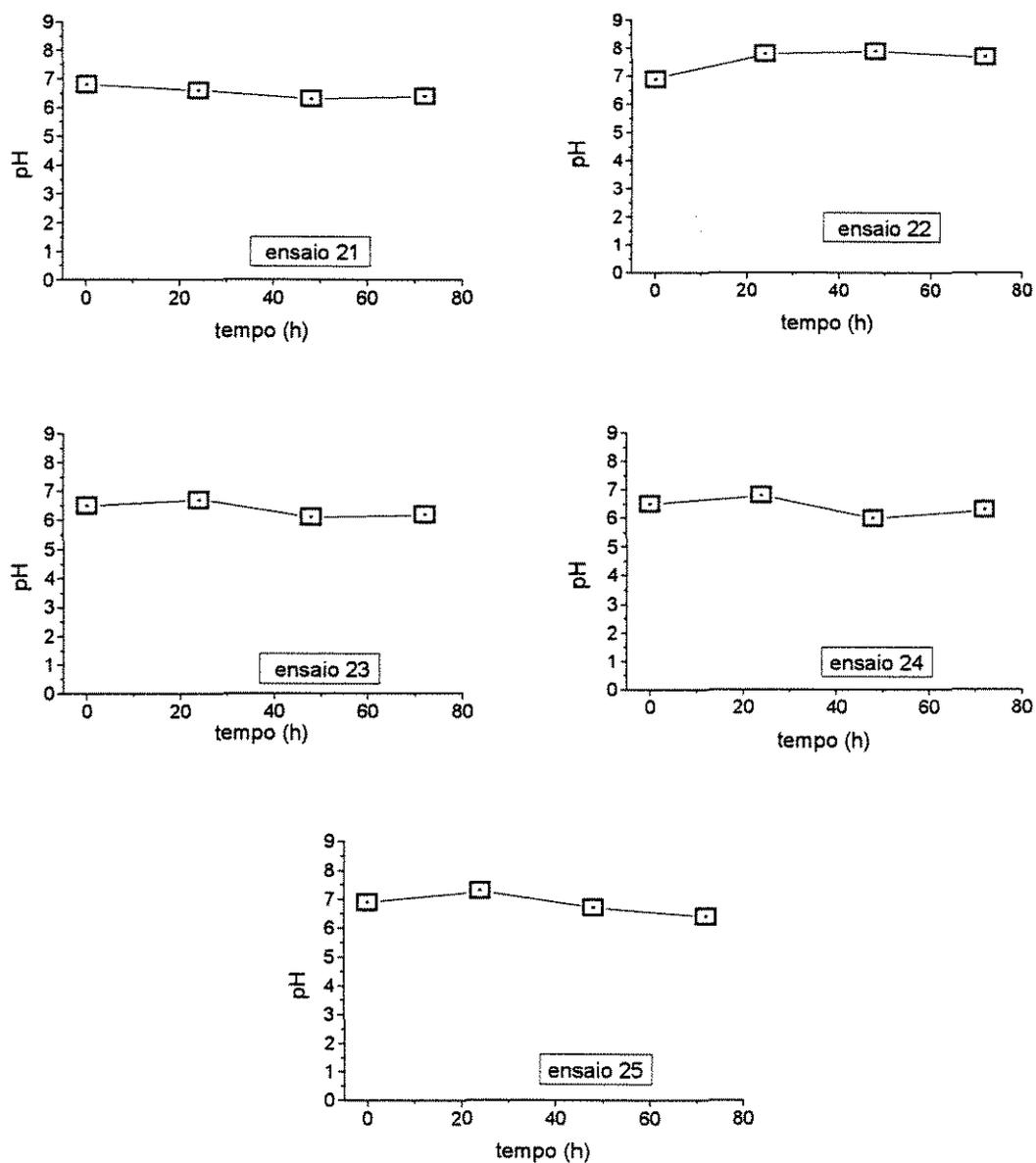


Figura 5.14: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaio 21 (S-G), 22 (S-S), 23 (S-GF), 24 (S-GS) e 25 (S-F).

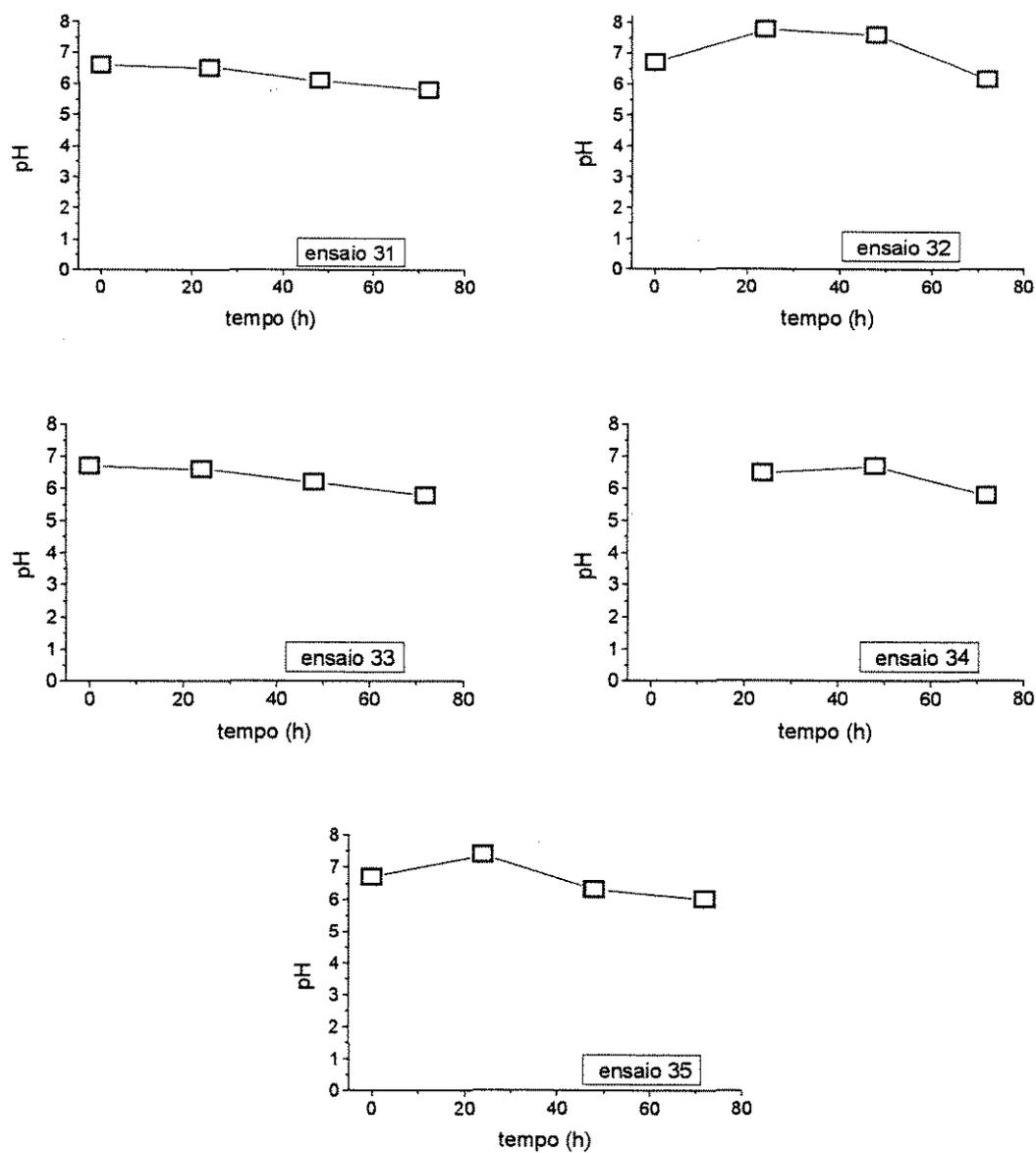


Figura 5.15: Comportamento do pH nas fermentações realizadas em frascos agitados. Ensaio 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).

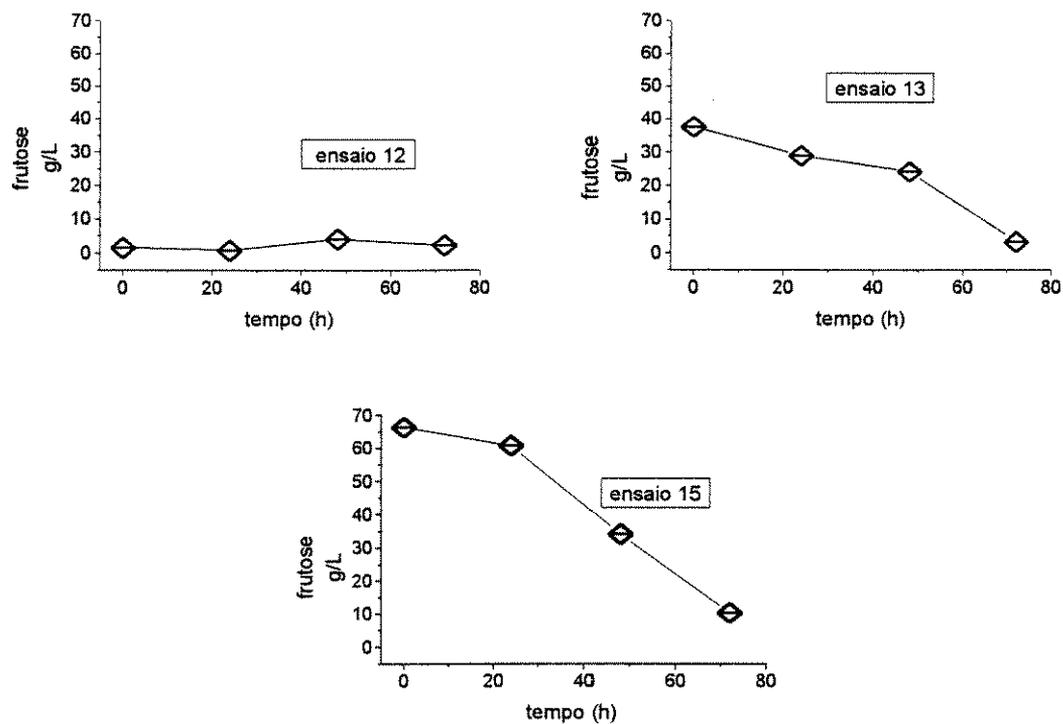


Figura 5.16: Concentração de frutose dosada durante os ensaios realizados em frascos agitados. Ensaio 12 (G-S), 13 (G-GF) e 15 (G-F).

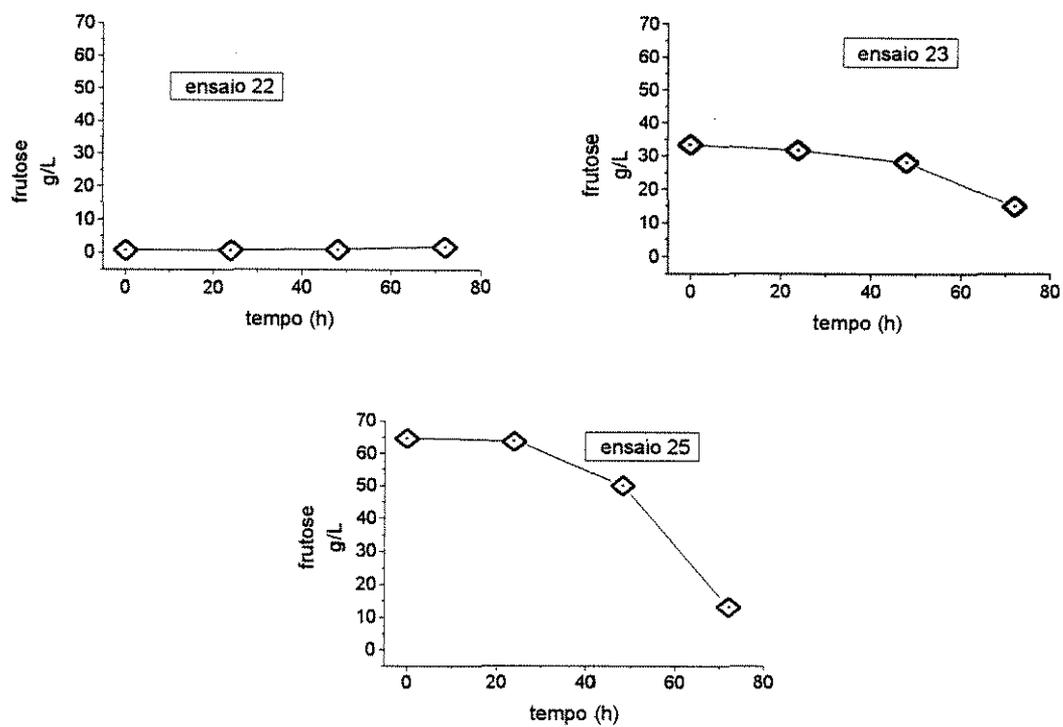


Figura 5.17: Concentração de frutose dosada durante os ensaios realizados em fracos agitados. Ensaios 22 (S-S), 23 (S-GF) e 25 (S-F).

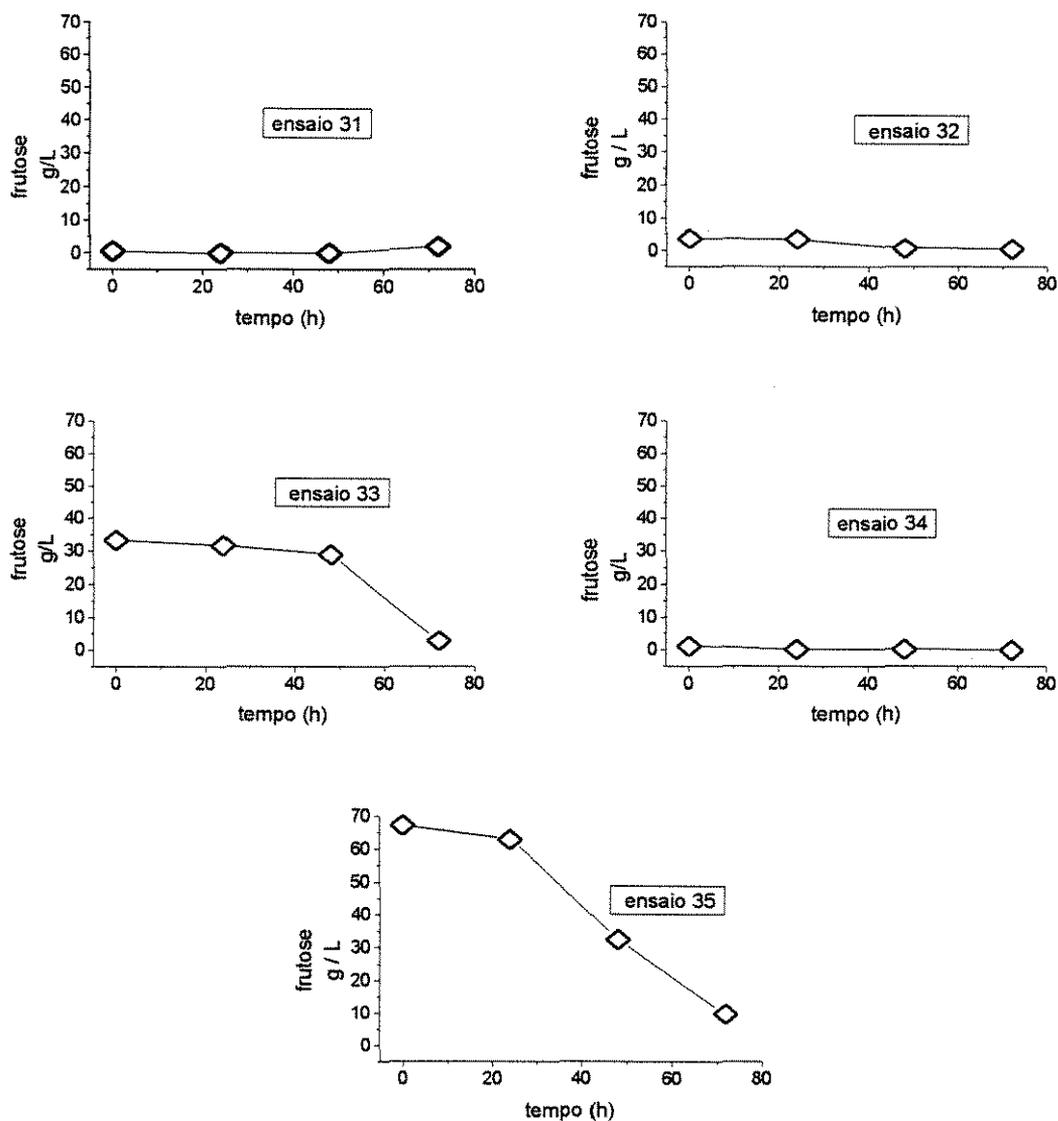


Figura 5.18: Concentração de frutose dosada nos ensaios de fracos agitados. Ensaio 31 (GF-G), 32 (GF-S), 33 (GF-GF), 34 (GF-GS) e 35 (GF-F).

Tabela 5.2: Resultados da fermentação 11, em que a glicose foi a única fonte de carbono, nas fases de preparo de inóculo e biossíntese do antibiótico.

Ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	glicose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cel.} .h)	pH
11	0	0,8	57,1	-	-	6,6
	24	5,9	47,6	0	0	6,4
	48	17,0	37,6	50	0,061	6,4
	72	29,5	7,1	133,0	0,064	6,0

Tabela 5.3: Resultados da fermentação 12, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cel.} .h)	pH
12	0	0,8	1,6	2,5	60,6	-	-	6,6
	24	3,9	0,8	1,3	57,9	0	0	7,8
	48	8,9	4,1	4,7	47,5	27,4	0,064	7,8
	72	22,1	2,4	1,1	19,3	124,0	0,081	6,5

Tabela 5.4: Resultados da fermentação 13, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e frutose foi usada na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cel.} .h)	pH
13	0	0,8	37,7	26,1	-	-	6,6
	24	6,7	29,0	20,3	0	0	6,6
	48	18,1	24,3	0	67,4	0,078	6,1
	72	28,3	3,4	0	130,0	0,066	5,8

Tabela 5.5: Resultados da fermentação 14, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{ccél.} .h)	pH
14	0	0,8	28,3	25,3	0	-	6,6
	24	5,1	18,2	27,6	0	0	6,4
	48	16,0	3,5	31,1	50,0	0,064	6,5
	72	24,2	1,0	14,3	304,0	0,180	5,8

Tabela 5.6: Resultados da fermentação 15, em que glicose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{ccél.} .h)	pH
15	0	1,1	66,4		0	6,7
	24	7,4	60,7	0	0	7,5
	48	18,6	34,1	62,0	0,069	6,0
	72	29,7	10,2	145,0	0,070	6,2

Tabela 5.7: Resultados da fermentação 21, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e glicose na fase da biossíntese do antibiótico.

Ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{ccél.} .h)	pH
21	0	0,8	60,3	2,5	0	-	6,8
	24	3,5	48,5	1,4	0	0	6,6
	48	12,1	42,1	1,6	56,8	0,098	6,3
	72	27,6	12,2	1,1	66,0	0,034	6,1

Tabela 5.8: Resultados da fermentação 22, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _X (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
	0	0,8	0,7	1,9	63,9	0	-	6,9
22	24	3,0	0,7	0,7	53,1	0	0	7,8
	48	4,0	0,9	1,1	43,5	28,7	0,150	7,9
	72	10,7	1,7	0,6	47,0	32,0	0,043	7,7

Tabela 5.9: Resultados da fermentação 23, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e frutose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _X (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
	0	0,8	33,5	59,6	0,9	0	-	6,5
23	24	3,4	31,7	53,3	3,7	0	0	6,7
	48	10,2	28,3	37,0	6,5	0	0	6,1
	72	25,3	14,9	0,3	0,2	64,0	0,036	6,2

Tabela 5.10: Resultados da fermentação 24, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _X (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
	0	0,8	23,5	35,2	0	-	6,5
24	24	3,3	20,2	36,2	0	0	6,8
	48	10,1	10,0	35,4	0	0	6,0
	72	23,0	1,1	9,5	111,0	0,068	6,3

Tabela 5.11: Resultados da fermentação 25, em que sacarose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
25	0	0,7	65,0	5,1	0	-	6,9
	24	3,0	63,8	4,0	0	0	7,3
	48	14,2	49,9	3,0	62,4	0,092	6,7
	72	26,2	12,9	0,8	140,0	0,076	6,4

Tabela 5.12: Resultados da fermentação 31, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e glicose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
31	0	0,8	0,5	58,7	0	-	6,6
	24	5,8	0	47,9	0	0	6,5
	48	18,2	0	32,3	56,8	0,065	6,1
	72	30,3	1,9	5,4	129,0	0,060	5,8

Tabela 5.13: Resultados da fermentação 32, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél.} .h)	pH
32	0	0,8	3,7	5,0	56,0	0	-	6,7
	24	5,0	3,5	4,0	52,0	0	0	7,8
	48	10,0	0,6	1,3	46,2	29,0	0,060	7,6
	72	20,0	0,5	0,2	29,0	148,0	0,110	6,2

Tabela 5.14: Resultados da fermentação 33, em que mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo, assim como na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél} .h)	pH
33	0	0,8	33,3	28,5	0	-	6,7
	24	6,0	31,8	21,5	0	0	6,6
	48	17,3	29,0	0,1	66,0	0,080	6,2
	72	27,1	2,8	0	132,0	0,070	5,8

Tabela 5.15: Resultados da fermentação 34, em que a mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e mistura de glicose e sacarose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél} .h)	pH
34	0	0,8	1,1	26,6	31,1	0	-	-
	24	5,2	-	26,1	30,8	0	0	6,5
	48	16,1	-	2,6	32,7	49,0	0,063	6,7
	72	21,4	-	0,6	19,9	264,0	0,137	5,8

Tabela 5.16: Resultados da fermentação 35, em que mistura de glicose e frutose foi usada na fase de preparo de inóculo e frutose na fase da biossíntese do antibiótico.

ensaio	tempo (h)	C _x (g/L)	frutose (g/L)	CPC (mg/L)	Pr _{esp} (mg/g _{cél} .h)	pH
35	0	1,1	67,1	0	-	6,7
	24	6,5	62,9	0	0	7,4
	48	21,2	32,4	62,7	0,062	6,3
	72	28,0	9,5	193,0	0,099	6,0

5.2. Fermentações realizadas em biorreator de tanque agitado

Os resultados obtidos das fermentações realizadas em biorreator de tanque agitado são apresentados nas tabelas 5.17 a 5.20 e figuras 5.19 a 5.22.

Esses ensaios tiveram o objetivo de caracterizar o desempenho na fermentação conduzida em batelada e batelada alimentada, e comparar os seus resultados em termos de produtividade específica.

Os ensaios A, B e C foram realizados em batelada alimentada e conduzidos em condições de glicose e sacarose distintas, como descrito na sessão 4.1.2.4, nas tabelas 4.8, 4.9 e 4.10. Utilizou-se no ensaio A a relação de glicose/sacarose 81:100, no ensaio B 27:126 e no ensaio C 26:187.

Tabela 5.17: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio A.

tempo (h)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	C _X (g/L)	CPC (mg/L)	Pr (mg _{CPC} /h.L)	Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{cél.} .h)
0	76,3	-	2,3	-	-	-
24	67,7	-	10,8	-	-	-
31	53,4	-	13,0	-	-	-
40	41,4	15,1	15,6	-	-	-
48	36,90	16,40	13,7	144,0	3,0	0,219
56	25,6	23,0	13,9	-	-	-
64	24,9	16,4	14,3	-	-	-
72	11,98	25,30	14,3	348,0	4,833	0,338
79	5,9	20,7	15,1			
88	1,24	28,76	16,2			
96	0,98	31,5	15,2			
102,5	0,46	15,5	15,0	595,0	5,805	0,387
120	-	10,8	15,6	466	3,883	0,249
126,5	0	7,60	15,7	1230,0	9,723	0,619
138	-	3,8	15,5	1114	8,072	0,521

Tabela 5.18: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio B.

tempo (h)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	C _X (g/L)	CPC (mg/L)	Pr (mg _{CPC} /h.L)	Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{cél.} .h)
0	25,12	-	1,53	-	-	-
9	22	-	3,37	-	-	-
17	18,68	-	6,16	-	-	-
24	9,92	-	9,92	-	-	-
32	0,05	-	14,81	-	-	-
36	0,02	0,28	14,2	13,62	0,378	0,027
41	0,03	2,51	14,11	-	-	-
43	0,03	0,45	14,66	-	-	-
48	-	0,45	14,16	124,3	2,590	0,183
57	-	0,54	13	-	-	-
65	-	0,53	13,69	125,5	1,931	0,141
72	-	0,74	13,66	204,1	2,835	0,208
83	-	0,78	13,24	-	-	-
89	-	0,86	12,86	342	3,843	0,299
96	-	0,89	13,86	724,4	7,546	0,544
106	-	0,8	13,07	-	-	-
113	-	0,91	14,39	824,3	7,295	0,506
120	-	0,78	13,96	479,6	3,997	0,286
138	-	-	12,33	241,5	1,75	0,142

Tabela 5.19: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas nos processos fermentativos, em regime de batelada alimentada. Ensaio C.

tempo (h)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	C _X (g/L)	CPC (mg/L)	Pr (mg _{CPC} /h.L)	Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{cél.} .h)
0	25,92	-	1,34	-	-	-
8	28,07	-	3,04	-	-	-
16	26,02	-	4,24	-	-	-
24	18,62	-	5,90	-	-	-
32	10,61	-	13,42	25,7	0,803	0,060
39	0,21	8,05	14,64	-	-	-
48	0,21	3,60	17,7	102,8	2,142	0,120
62	0,29	0,23	18,68	-	-	-
72	0,15	0,58	23,9	515,4	7,158	0,300
88,5	0,15	6,36	19,32	-	-	-
96	0,15	9,81	18,2	646,2	6,731	0,369
112	0,15	7,97	20,76	553,0	4,938	0,238
120	-	3,12	21,44	597,0	4,975	0,232
135	-	0,15	19,56	465,1	3,445	0,176

Empregou-se no ensaio D a relação glicose/sacarose 27:36 conforme descrito na seção 4.1.2.4 e tabelas 4.9 e 4.10.

Tabela 5.20: Concentrações de glicose, sacarose, massa celular, CPC, e produtividade específica obtidas no processo fermentativo, em regime de batelada. Ensaio D.

Tempo (h)	glicose (g/L)	sacarose (g/L)	C _x (g/L)	CPC (mg/L)	Pr (mg _{CPC} /h.L)	Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{cel.} .h)
5,1	27,63	35,74	2,72	-	-	-
14,1	27,90	34,8	5,65	-	-	-
17,0	26,81	29,78	4,31	-	-	-
22,1	25,62	29,78	9,96	-	-	-
29,0	21,97	30,84	9,04	9,89	0,341	0,038
34,0	15,76	34,80	12,84	-	-	-
38,2	11,39	31,0	16,6	-	-	-
41,0	4,79	29,4	17,96	-	-	-
46,3	0,27	23,34	21,7	67,8	1,464	0,068
52,2	0,27	21,54	20,34	151,68	2,906	0,143
69	-	3,0	18,70	471,65	6,836	0,366
77,8	-	1,20	18,10	693,13	8,909	0,492
96	-	0,66	15,5	1093,0	11,385	0,735
120,0	-	0,90	12,13	439,00	3,658	0,302
126,0	-	0,98	11,75	393,48	3,123	0,266

As figuras de 5.19 a 5.22 e 5.24 apresentam os resultados obtidos das produtividades específicas para os ensaios A, B, C e D. O ensaio D atingiu a maior produtividade específica e o segundo maior valor foi o do ensaio A.

A partir das tabelas 5.17, 5.18 e 5.19 e figuras 5.23, 5.24 e 5.25 pode-se observar que dentre os ensaios realizados em fermentador de tanque agitado, em regime de batelada alimentada, as curvas obtidas experimentalmente apresentaram o seguinte comportamento para 72 horas de fermentação,

$$Pr_{espA} > Pr_{espC} > Pr_{espB}$$

$$CPC_C > CPC_A > CPC_B.$$

$$Pr_C > Pr_A > Pr_B$$

E os seguintes resultados para um tempo superior a 100 horas de fermentação,

$$\begin{aligned} Pr_{\text{espA}} > Pr_{\text{epsB}} > Pr_{\text{espC}} & \qquad \qquad \qquad CPC_A > CPC_B > CPC_C. \\ Pr_A > Pr_C > Pr_B & \end{aligned}$$

Pelas tabelas 5.17, 5.18, 5.19 e 5.20, e pelas figuras 5.23, 5.24 e 5.25 é possível comparar as fermentações realizadas nos dois regimes de operação batelada alimentada e batelada. A produtividade do ensaio D, a partir de aproximadamente 72 horas de fermentação atingiu valor superior. E a partir das 100 horas, pode-se observar a seguinte ordem:

$$\begin{aligned} Pr_{\text{espD}} > Pr_{\text{espA}} > Pr_{\text{epsB}} > Pr_{\text{espC}} & \qquad \qquad \qquad CPC_D > CPC_A > CPC_B > CPC_C. \\ Pr_D > Pr_A > Pr_C > Pr_B & \end{aligned}$$

Comparando os resultados dos ensaios C e A, observa-se a partir das 100 horas, a produtividade do ensaio C caiu rapidamente.

Pelos resultados apresentados na tabela 5.21, se compararmos os parâmetros de velocidade de crescimento $\mu_{\text{máx1}}$ e $\mu_{\text{máx2}}$ e os coeficientes de rendimento da biomassa formada durante o consumo de glicose e da sacarose $Y_{x/s1}$ e $Y_{x/s2}$ para os ensaios A, B e C, verifica-se que:

$$\begin{aligned} (Y_{x/s1})_C > (Y_{x/s1})_B > (Y_{x/s1})_A & \qquad \qquad \qquad (\mu_{\text{máx1}})_C > (\mu_{\text{máx1}})_B > (\mu_{\text{máx1}})_A \\ (Y_{x/s2})_C > (Y_{x/s2})_B > (Y_{x/s2})_A & \qquad \qquad \qquad (\mu_{\text{máx2}})_C > (\mu_{\text{máx2}})_B > (\mu_{\text{máx2}})_A \end{aligned}$$

Tabela 5.21: Concentrações iniciais de glicose e sacarose empregadas em cada ensaio. Parâmetros cinéticos de crescimento estimados: $\mu_{\max 1}$; $\mu_{\max 2}$; $Y_{x/s1}$ e $Y_{x/s2}$. Ensaios A, B e C (batelada alimentada), ensaio D (batelada).

parâmetro	ensaio			
	A	B	C	D
glicose inicial (g/L)	81	27	26	27
sacarose inicial (g/L)	100	126	187	36
tempo (h)	127	113	96	96
$Y_{x/s1}$	0,182	0,465	0,600	0,501
$Y_{x/s2}$	0,004	0,089	0,427	0,071
$\mu_{\max 1}$	0,022	0,046	0,059	0,054
$\mu_{\max 2}$	0,003	0,026	0,003	0,057
CPC_{\max} (g/L)	1230	824	646	1093
Pr (mg _{CPC} /h.L)	9,685	7,292	6,729	11,385
Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{cél.} .h)	0,619	0,507	0,369	0,734

Com estes resultados a expectativa era de que o ensaio C fornecesse a maior produtividade. Ocorreu exatamente o contrário, o ensaio C atingiu a menor produtividade. Em função das concentrações de glicose e sacarose empregadas, a repressão e/ou inibição catabólica deveria ser notada mais acentuadamente em A do que em B do que em C. No entanto, a produtividade de A foi superior. Pode ter ocorrido uma perda da produtividade não identificada da própria linhagem de *C. acremonium*, no caso do ensaio C. Foi observado, durante as atividades em laboratório, que às vezes a partir do cultivo em meio sólido ocorriam alterações indesejáveis no inóculo formado, como por exemplo, junto com as hifas a presença de células peletizadas naturalmente, que posteriormente desapareciam durante a operação no fermentador. O ensaio C apresentou esta particularidade, o que pode ter influenciado no metabolismo para a formação das enzimas β -lactâmicas (figura 5.21)

No ensaio B pode ser visto que apesar dos coeficientes de rendimento da biomassa na glicose e sacarose terem sido superiores aos do ensaio A, a produtividade foi inferior a dos demais ensaios e não ocorreu peletização. O ensaio B foi realizado com a concentração inicial de glicose igual a do ensaio C, e a concentração de sacarose usada foi inferior a concentração usada no ensaio C (figura 5.20).

Nas tabelas 5.18 e 5.19 e figuras 5.20 e 5.21 pode ser visto que a suplementação da sacarose para o ensaio B se iniciou às 36 horas de fermentação, quando esta já estava se processando há 6 horas na quase ausência de glicose. No ensaio C a suplementação de sacarose ocorreu em 39 horas, porém não ocorreu falta de açúcar.

No ensaio A, a suplementação de sacarose ocorreu em 40 horas de fermentação, quando a glicose ainda não havia sido esgotada. Tal esgotamento só ocorreu por volta de 80 horas. A literatura comenta sobre o efeito da inibição e/ou repressão das enzimas β -lactâmicas pela glicose, mas segundo Shen *et al.* (1986), a linhagem *C. acremonium* em estudo apresenta sensibilidade relativamente baixa à presença de glicose, conseguindo produzir cefalosporina C na presença de glicose. A tabela 5.17 e figuras 5.19 e 5.23 mostram que em 48 horas a produtividade de cefalosporina C $Pr_{\text{espA}} = 0,219 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél.}}\cdot\text{h}$ era superior a dos ensaios B, C e D.

Estes resultados indicam que a relação de glicose:sacarose de 27:36 sugerida por Demain para os ensaios em batelada não deve ser considerada para os ensaios em batelada alimentada. Para cada modo de operação do biorreator há uma relação adequada. Este fato foi evidenciado pelo ensaio D, que é mostrado na tabela 5.20 e figuras 5.22, 5.23, 5.24 e 5.25, no qual foi empregada a relação de glicose:sacarose de 27:36, o biorreator foi operado em batelada e a produtividade superior a todos os demais ensaios, apesar dos parâmetros cinéticos terem atingido os seguintes valores:

$$(Y_{x/s1})_A > (Y_{x/s1})_C > (Y_{x/s1})_D > (Y_{x/s1})_B$$

$$(\mu_{\text{máx1}})_C > (\mu_{\text{máx1}})_D > (\mu_{\text{máx1}})_B > (\mu_{\text{máx1}})_A$$

$$(Y_{x/s2})_A > (Y_{x/s2})_C > (Y_{x/s2})_D > (Y_{x/s2})_B$$

Sobre o tempo de esgotamento da glicose, o ensaio C apresentou um atraso de aproximadamente 8 horas em relação ao ensaio B, enquanto que D se mostrou ~14 horas atrasado em relação a B. No ensaio A era esperado um atraso maior devido à utilização da alta concentração de glicose, as figuras 5.19, 5.20, 5.21 e 5.22 mostram esta ocorrência.

Analisando os tempos de esgotamento da glicose entre os ensaios em batelada (D) e batelada alimentada (B e C), cujas concentrações de glicose eram iguais, pelas figuras 5.20, 5.21 e 5.22 constatou-se que o esgotamento da glicose se deu mais rapidamente quando a operação ocorreu em batelada alimentada do que em batelada. Assim sendo, para se conseguir altas produtividades de antibiótico operando biorreatores em batelada alimentada deverá ser investigada qual a melhor relação de glicose/sacarose a ser empregada.

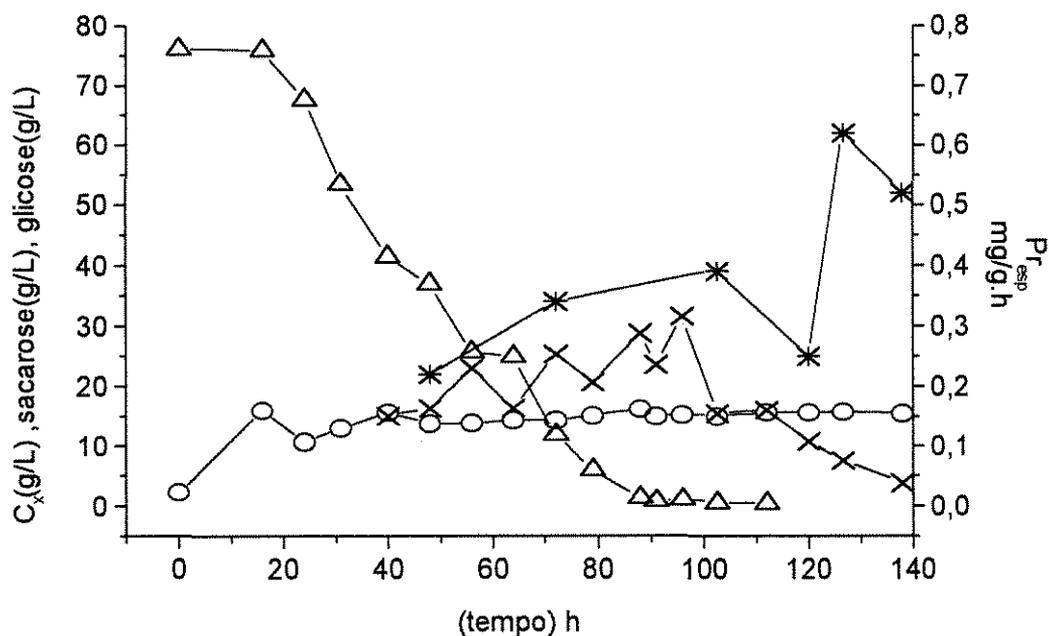


Figura 5.19 Ensaio A. Concentrações de massa seca (C_x , O), sacarose (×), glicose (Δ) e produtividade específica de CPC (∗). Vazão suplementar de sacarose 0,36 mL/min.

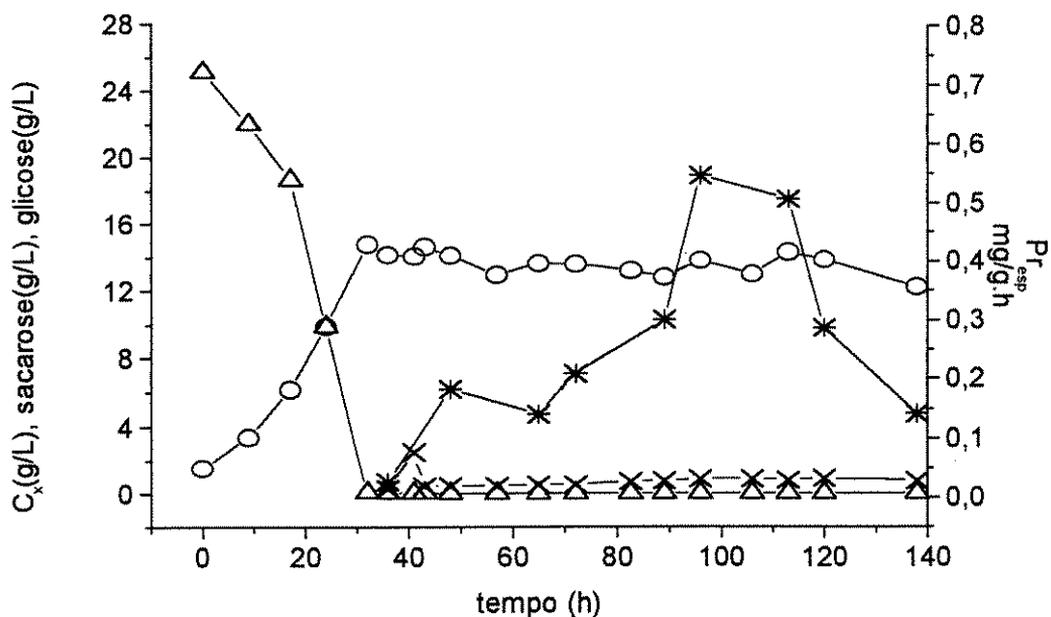


Figura 5.20: Ensaio B. Concentrações de massa seca (C_x , ○), sacarose (×), glicose (△) e produtividade específica de CPC (*). Vazão suplementar de sacarose 0,24 mL/min.

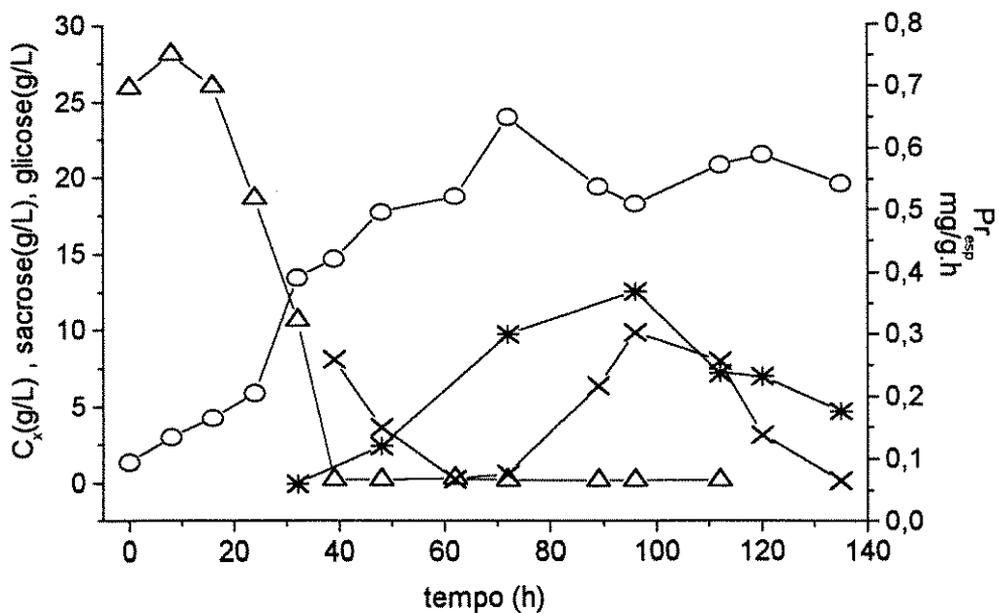


Figura 5.21: Ensaio C. Concentrações de massa seca (C_x , ○), sacarose (×), glicose (△) e produtividade específica de CPC (*). Vazão suplementar de sacarose 0,33 mL/min.

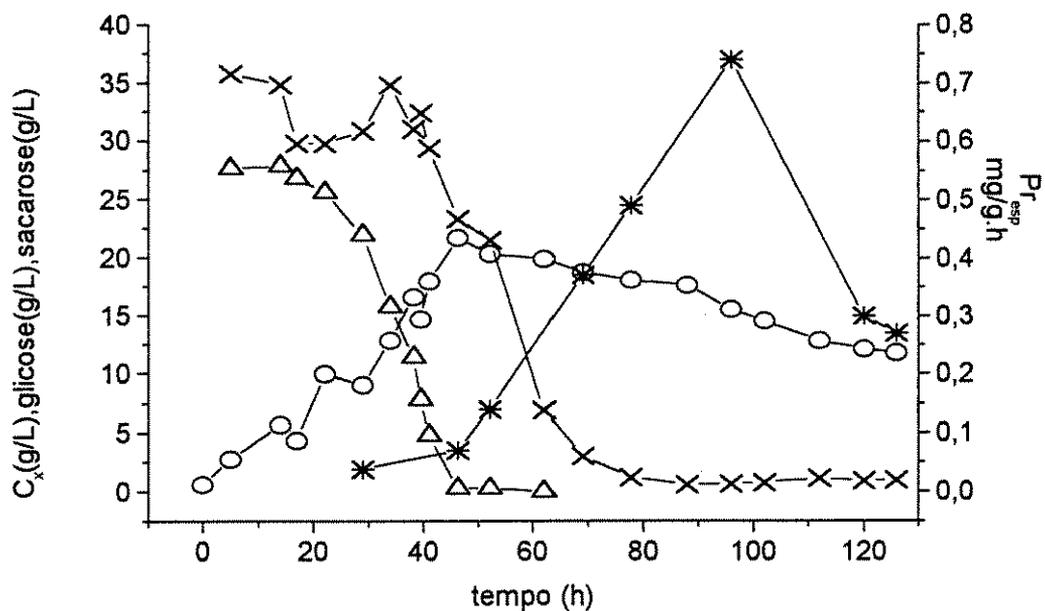


Figura 5.22: Ensaio D. Concentrações de massa seca (C_x , ○), sacarose (×), glicose (△) e produtividade específica de CPC (*).

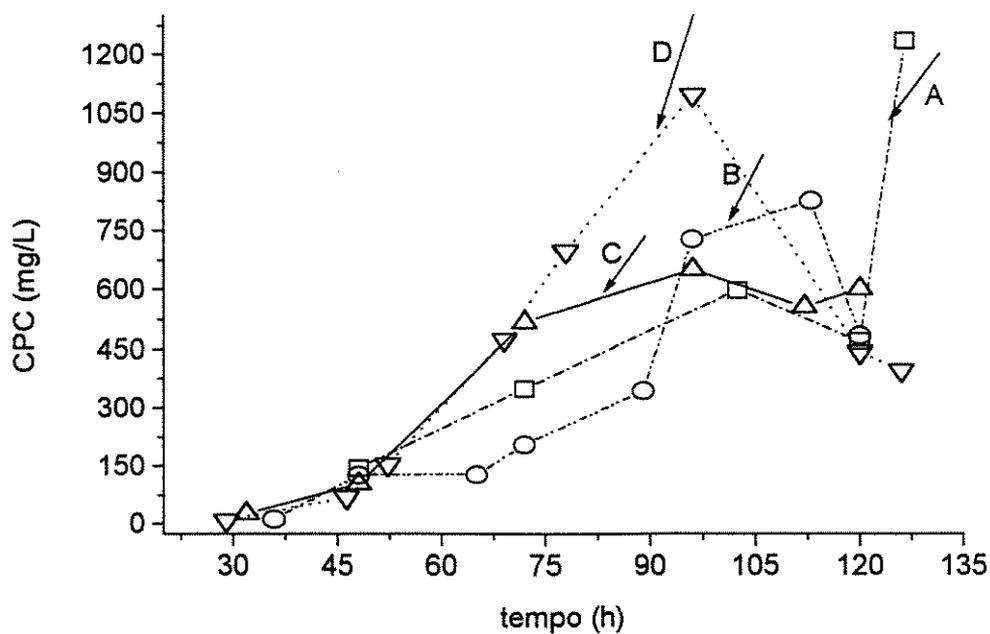


Figura 5.23: Concentração de CPC obtida nos ensaios no fermentador. A (□), B (○) e C (△) (fermentações em batelada alimentada). D (▽) (fermentação em batelada).

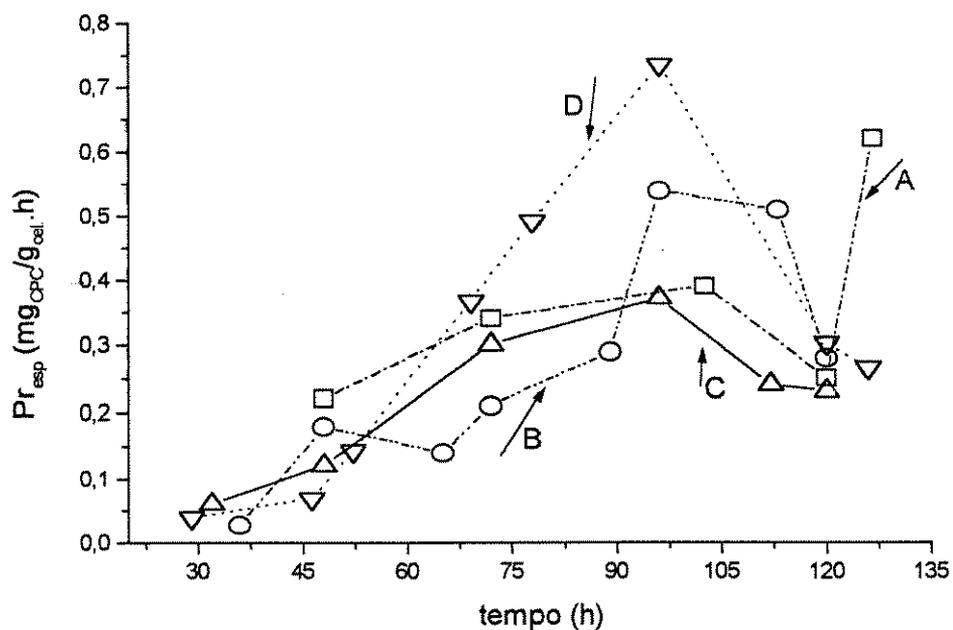


Figura 5.24: Produtividade específica obtida nos ensaios realizados no fermentador. A (\square), B (\circ) e C (\triangle) (fermentações em batelada alimentada). D (∇) (fermentação em batelada).

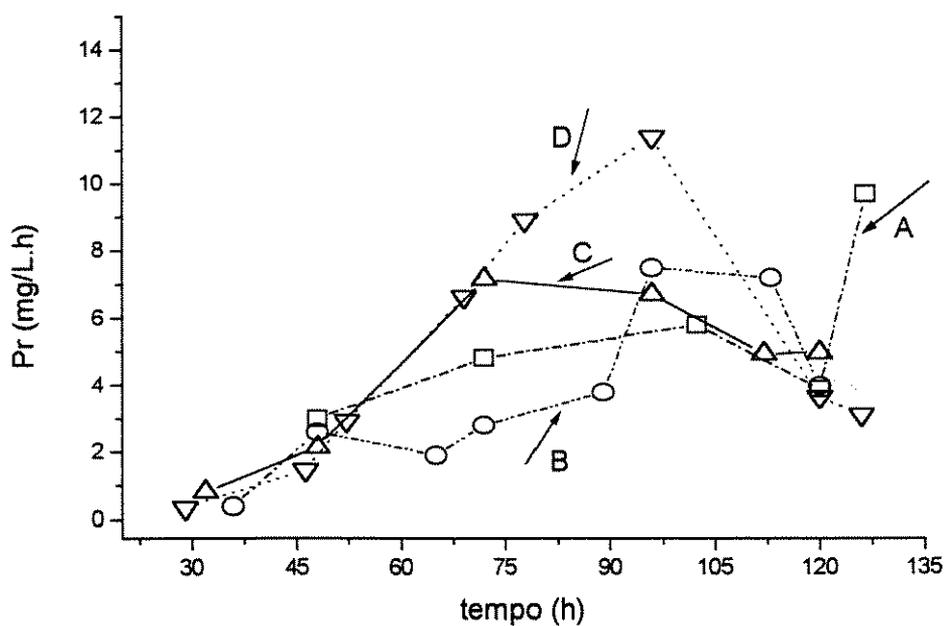


Figura 5.25: Produtividade obtida nos ensaios realizados em fermentador. A (\square), B (\circ) e C (\triangle) (fermentações em batelada alimentada). D (∇) (fermentação em batelada).

5.2.1. Comparação do desempenho dos processos conduzidos em frascos agitados e em biorreator de tanque agitado em batelada e batelada alimentada

Considerando a importância da comparação do desempenho atingido entre os processos conduzidos em frascos agitados e em biorreator de tanque agitado, são apresentados na tabela 5.22 os resultados obtidos dos ensaios A e D (biorreator de tanque agitado) e ensaio 14 (frascos agitados).

Tabela 5.22: Resultados das fermentações realizadas em frascos agitados e em fermentador tipo tanque agitado, que forneceram maiores produtividades. A (batelada alimentada); D (batelada); 14 (frascos agitados).

	Ensaio A			ensaio D			ensaio 14		
Tempo (h)	48	72	126,5	46,3	77,8	96,0	24	48	72
C_x (g/L)	13,7	14,3	15,7	21,7	18,1	15,5	5,1	16,0	24,2
CPC (mg/L)	144,0	348,0	1230,0	67,8	693,1	1093,0	0	80,0	304,0
Pr (mg _{CPC} /h.L)	3,0	4,8	9,7	1,5	9,0	11,4	0	1,1	4,2
Pr _{esp} (mg _{CPC} /g _{ca} .h)	0,219	0,338	0,619	0,068	0,492	0,733	0	0,064	0,180

A seguir, por meio das figuras 5.26, 5.27 e 5.28, pode ser visto o resultado dos ensaios realizados em frascos agitados (ensaio 14) e em biorreator tipo tanque (ensaio A em batelada alimentada e ensaio D em batelada).

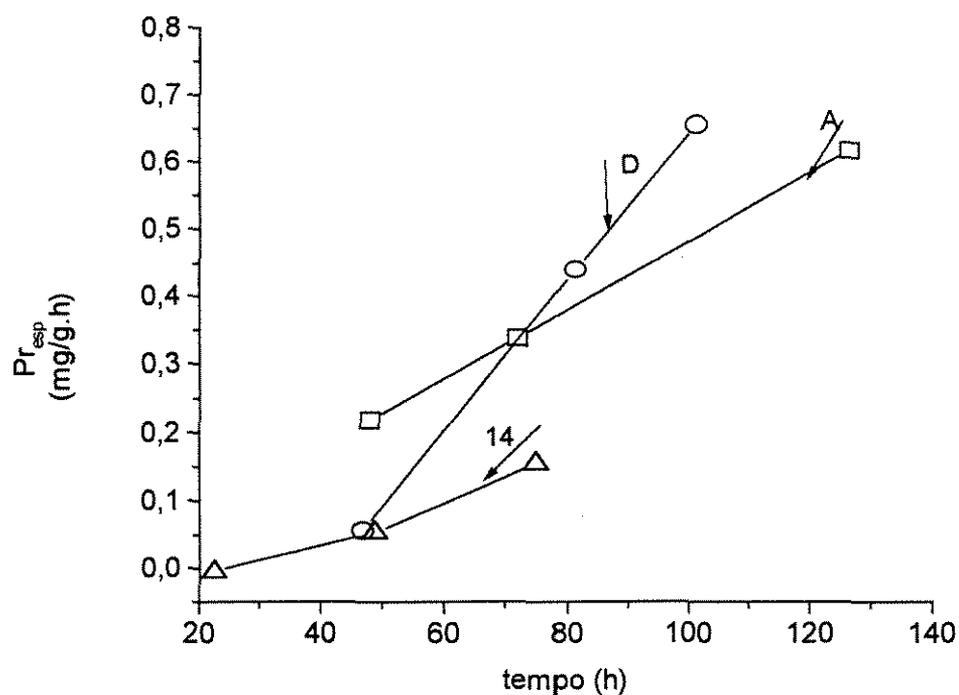


Figura 5.26: Produtividade específica em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.

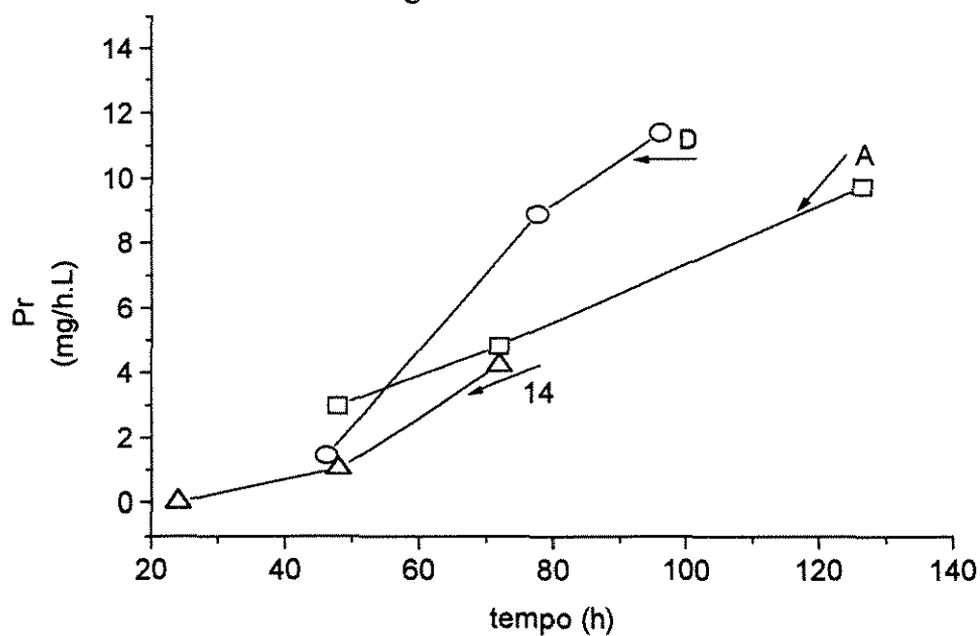


Figura 5.27: Produtividade em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.

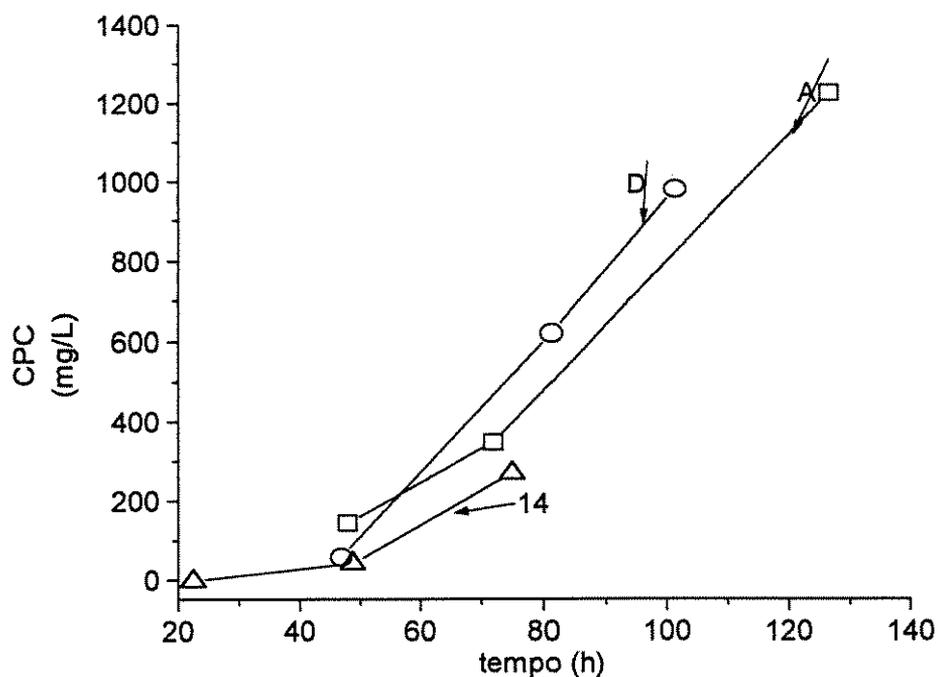


Figura 5.28: CPC em função do tempo. Ensaio A (batelada alimentada), D (batelada) realizados em fermentador. Ensaio 14 realizado em frascos agitados.

Pela tabela 5.22 e figura 5.26 observa-se que produtividade específica atingida para o ensaio 14, em frascos agitados, foi inferior às produtividades dos ensaios D e A.

Este resultado está associado às condições de agitação, aeração e pH no biorreator de tanque agitado que são mais controláveis do que em frascos agitados.

5.3. Caracterização reológica dos caldos de fermentação e morfologia.

A caracterização reológica do caldo de fermentação ao longo do processo foi feita através de medidas da percentagem de torque (%T) e da velocidade do impulsor, N, conforme os procedimentos citados no item 4.2.2.6.2.

As figuras 5.29 a 5.31 apresentam a caracterização reológica obtida do ensaio B bem como a viscosidade aparente dentro do biorreator, de acordo com os resultados contidos na tabela 5.23.

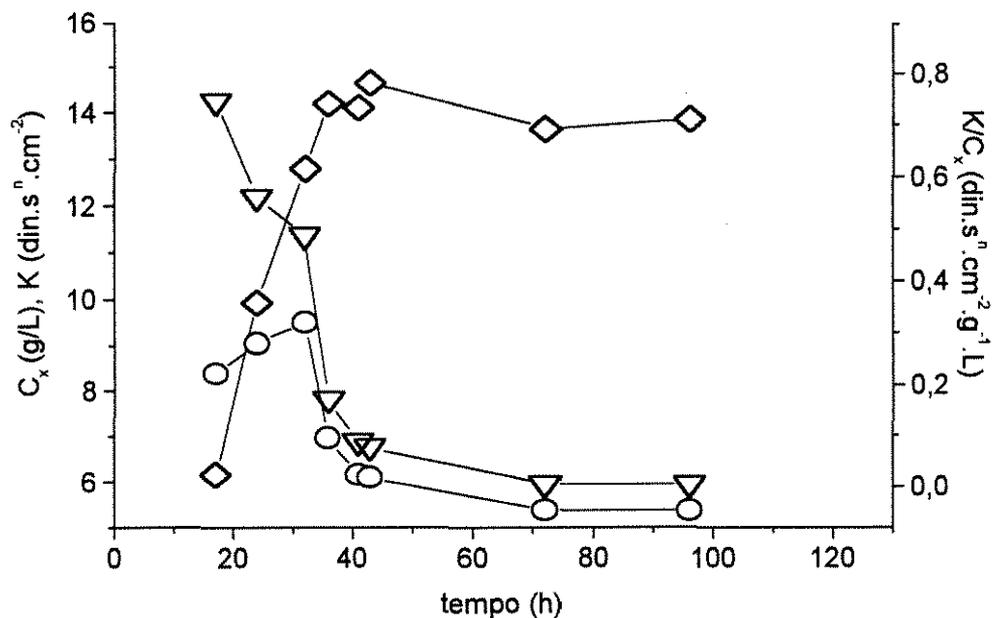


Figura 5.29: Ensaio B. Massa seca (C_x), índice de consistência (K), e K/C_x em função do tempo. (\circ) K ; (\diamond) C_x ; (∇) K/C_x .

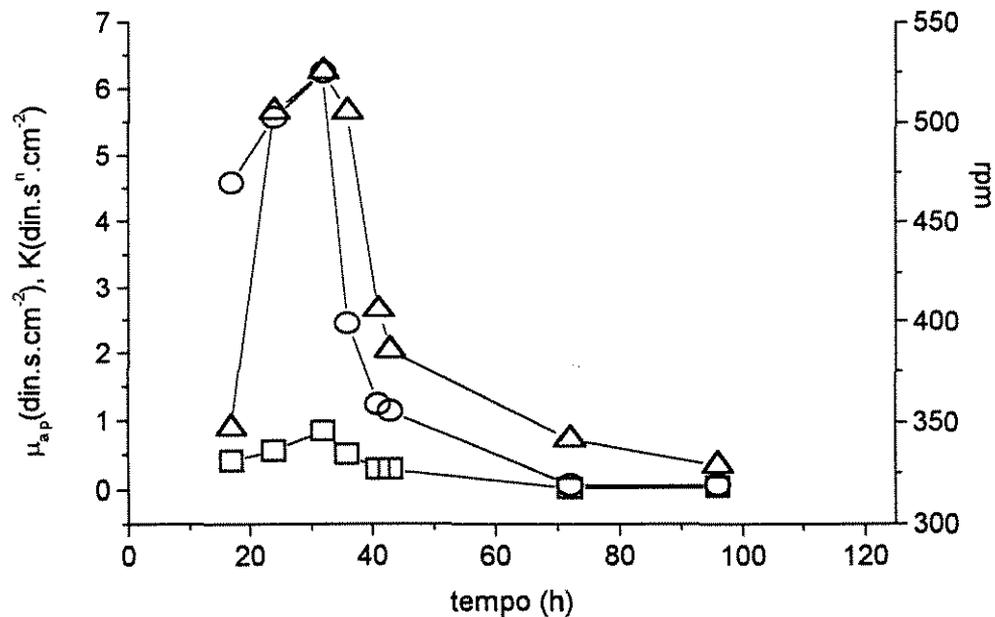


Figura 5.30: Ensaio B. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (○) K; (□) viscosidade; (△) rpm.

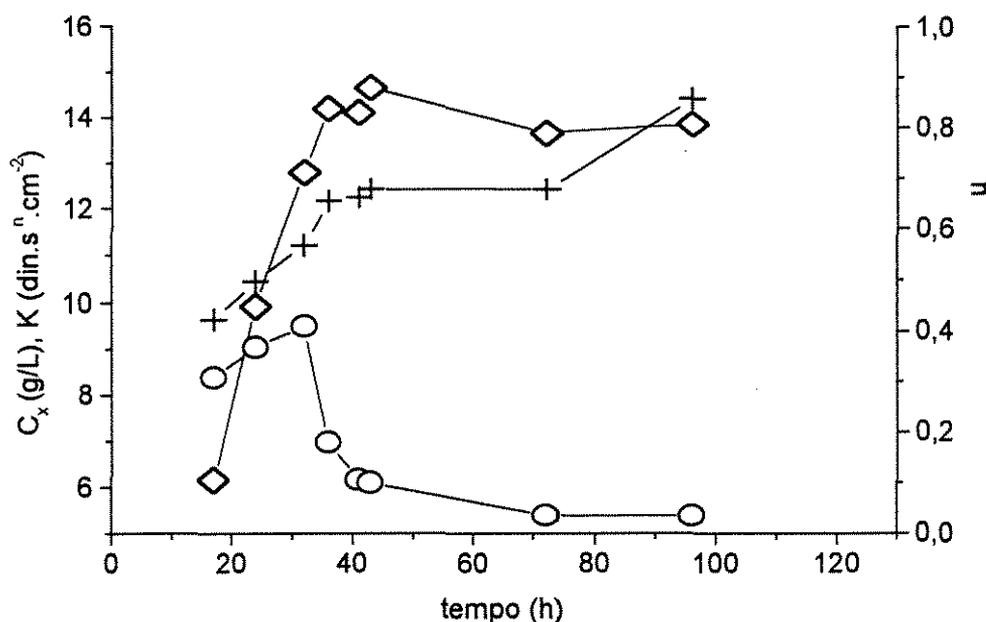


Figura 5.31: Ensaio B. Massa seca (C_x), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (○) K; (◇) C_x ; (+) n.

Tabela 5.23: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio B.

tempo (h)	massa seca C_x (g/L)	N (rpm)	n	K (din.s ⁿ .cm ⁻²)	μ_{ap} (din.s.cm ⁻²)
17	6,16	346	0,422	4,580	0,4053
24	9,92	505	0,495	5,560	0,5521
32	12,81	525	0,565	6,240	0,8393
36	14,20	505	0,653	2,444	0,5000
41	14,11	405	0,662	1,244	0,2857
43	14,66	385	0,678	1,141	0,2856
48	14,16	347	0,537	0,776	0,1111
72	13,66	341	0,676	0,069	0,0178
96	13,86	328	0,856	0,050	0,0275
120	13,96	320	0,877	0,042	0,0253

As figuras 5.32 a 5.34 apresentam a caracterização reológica obtida do ensaio C bem como a viscosidade aparente dentro do biorreator, de acordo com os resultados contidos na tabela 5.24.

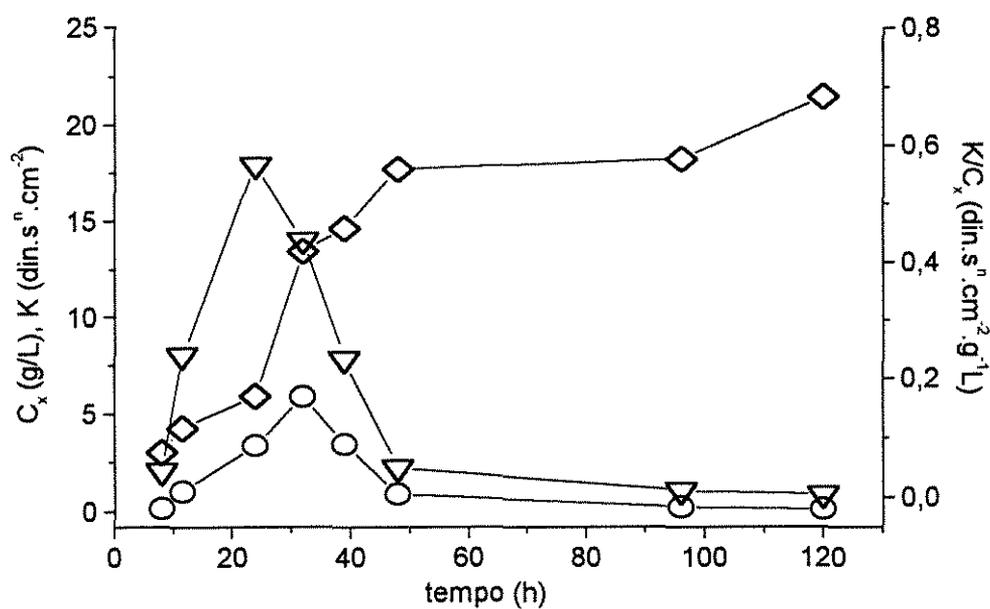


Figura 5.32: Ensaio C. Massa seca (C_x), índice de consistência (K), e K/C_x em função do tempo. (\circ) K ; (\diamond) C_x ; (∇) K/C_x .

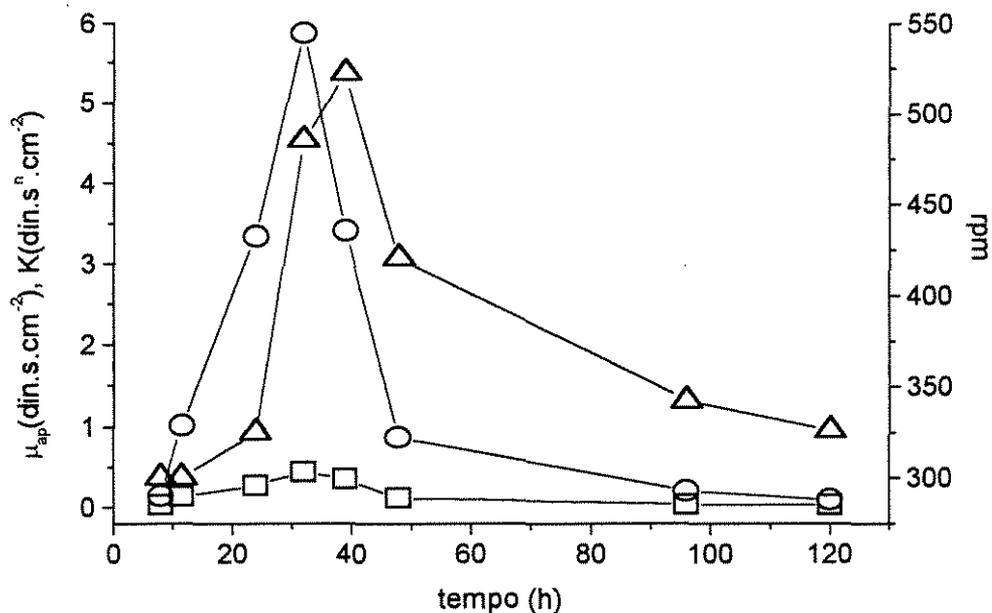


Figura 5.33: Ensaio C. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (○) K; (□) viscosidade; (Δ) rpm.

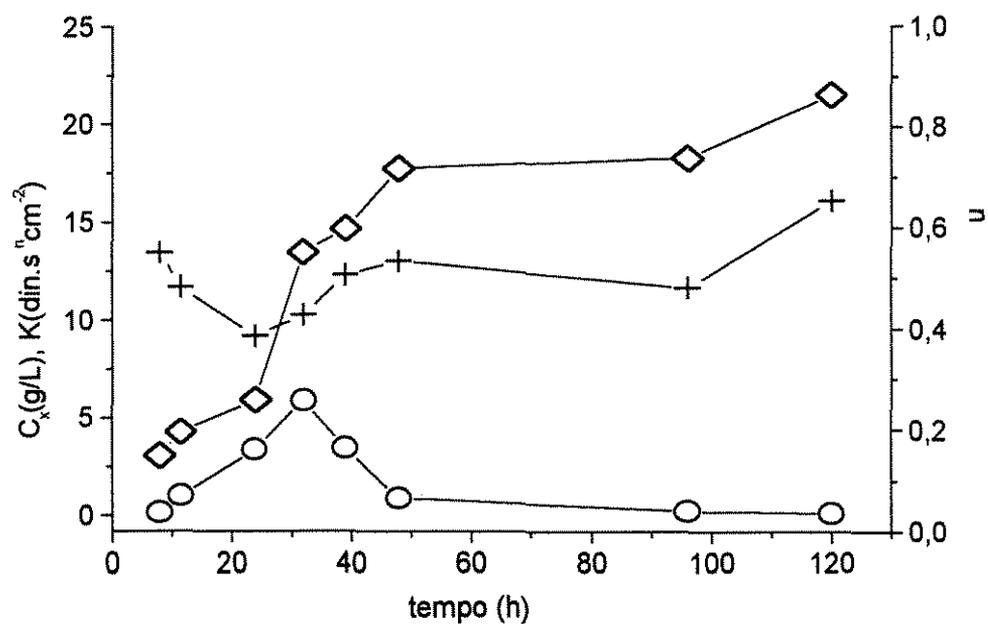


Figura 5.34: Ensaio C. Massa seca (C_x), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (○) K; (◇) C_x ; (+) n.

Tabela 5.24: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio C.

tempo (h)	massa seca C_x (g/L)	N (rpm)	n	K (din.s ⁿ .cm ⁻²)	μ_{ap} (din.s.cm ⁻²)
8,0	3,04	300	0,5570	0,1349	0,0224
11,6	4,24	300	0,4844	1,0160	0,126
24,0	5,90	325	0,3869	3,3410	0,2650
32,0	13,42	485	0,4275	5,8740	0,4390
39,0	14,64	522	0,5055	3,4140	0,3500
48,0	17,72	420	0,5328	0,8676	0,1120
62,0	18,68	39,4	0,4060	1,2340	0,0946
96,0	18,22	342	0,4804	0,1921	0,0219
120,0	21,44	326	0,6526	0,0921	0,0219

As figuras 5.35 a 5.37 apresentam a caracterização reológica obtida do ensaio D bem como a viscosidade aparente dentro do biorreator, de acordo com os resultados contidos na tabela 5.25.

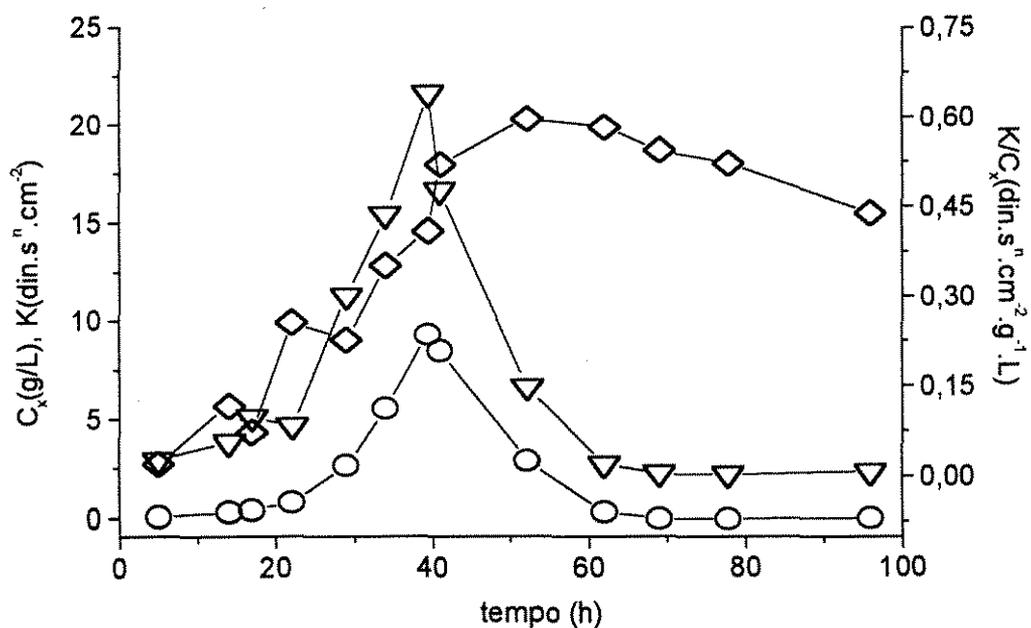


Figura 5.35: Ensaio D. Massa seca (C_x), índice de consistência (K), e K/C_x em função do tempo. (○) K; (◇) C_x ; (▽) K/C_x .

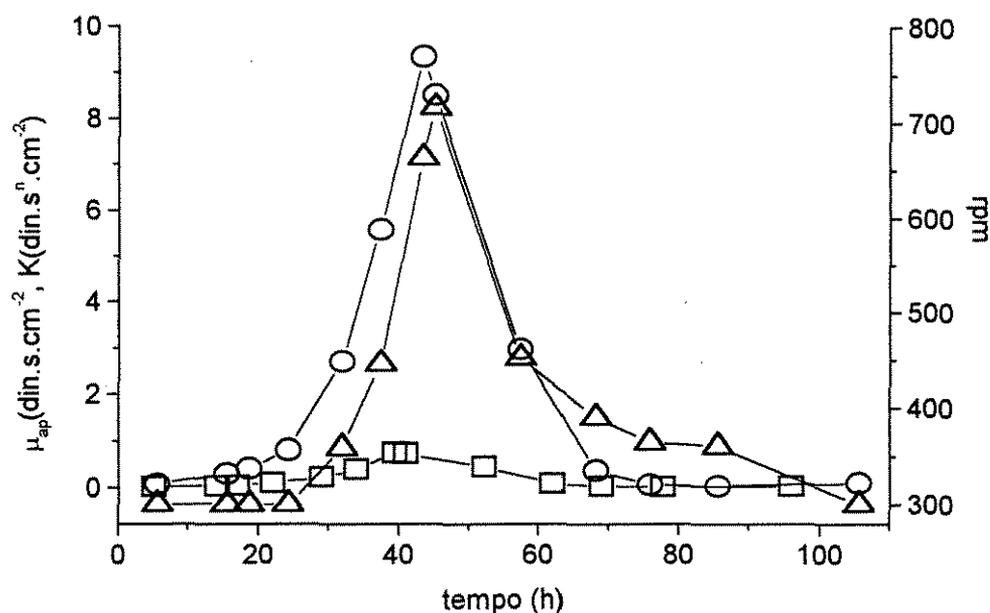


Figura 5.36: Ensaio D. Índice de consistência (K), viscosidade aparente (μ_{ap}) e rotação do impulsor (rpm) em função do tempo. (○) K; (□) viscosidade; (△) rpm.

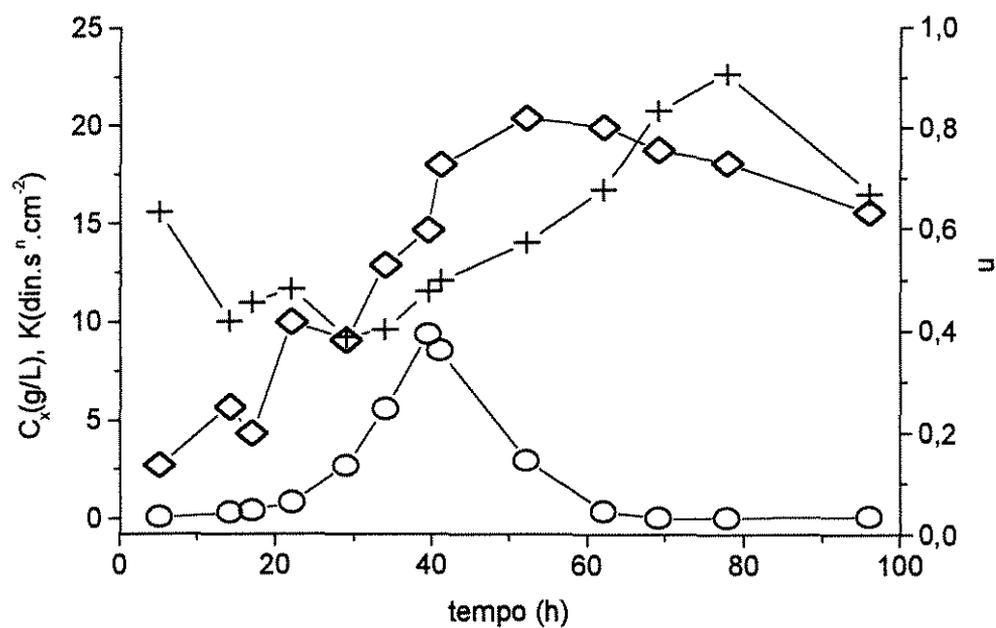


Figura 5.37: Ensaio D. Massa seca (C_x), índice de consistência (K) e índice de escoamento (n) em função do tempo. (○) K; (◇) C_x ; (+) n.

Tabela 5.25: Concentrações de massa celular, velocidade do impulsor, índice do comportamento do escoamento, índice de consistência e viscosidade aparente resultantes do ensaio D.

tempo (h)	massa seca C_x (g/L)	N (rpm)	n	K ($\text{din.s}^n.\text{cm}^{-2}$)	μ_{ap} (din.s.cm^{-2})
5,1	2,72	300	0,6347	0,0623	0,0142
14,1	5,65	300	0,4195	0,2929	0,0279
17,0	4,31	300	0,4549	0,4068	0,0447
22,1	9,96	300	0,4826	0,7907	0,0972
29,0	9,04	359	0,3883	2,6951	0,2030
34,0	12,84	446	0,4027	5,5721	0,3910
38,2	16,60	605	0,5152	6,8631	0,6850
39,5	14,62	662	0,4774	9,3451	0,7440
41,0	17,96	715	0,4981	8,5181	0,7210
46,3	21,69	548	0,5914	4,8271	0,7210
52,2	20,34	452	0,5734	2,9630	0,4420
62,0	19,89	390	0,6748	0,3558	0,0875
69,0	18,70	364	0,8335	0,0509	0,0251
77,8	18,05	360	0,9065	0,0288	0,0194
96,0	15,53	300	0,6698	0,0964	0,0253

As figuras 5.38 e 5.39 permitem uma análise comparativa da caracterização reológica obtida nos ensaios B, C e D por meio do índice de escoamento e do índice de consistência em função do tempo.

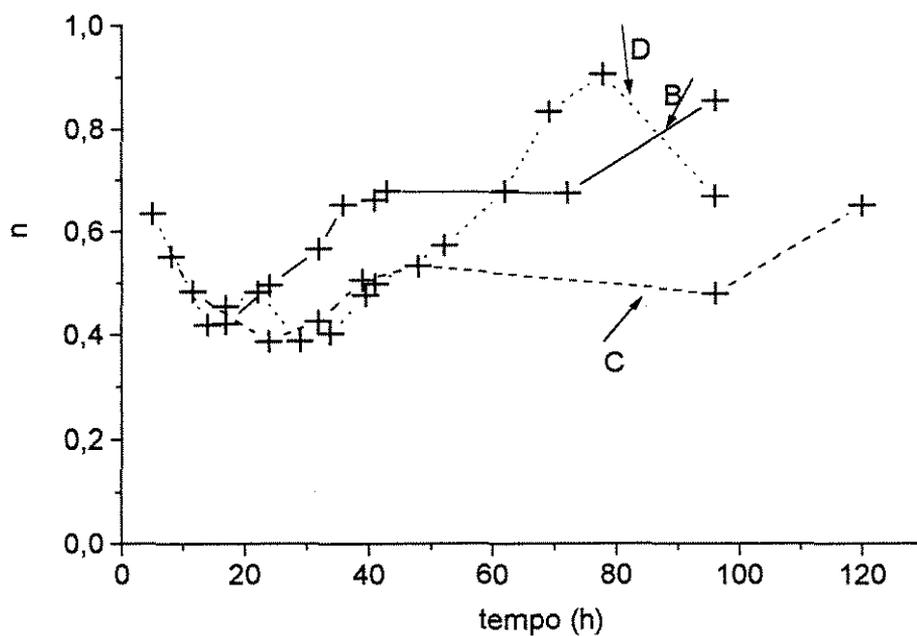


Figura 5.38: Índice de escoamento (n) em função do tempo. Ensaios B (—), C (- - -) e D (.....).

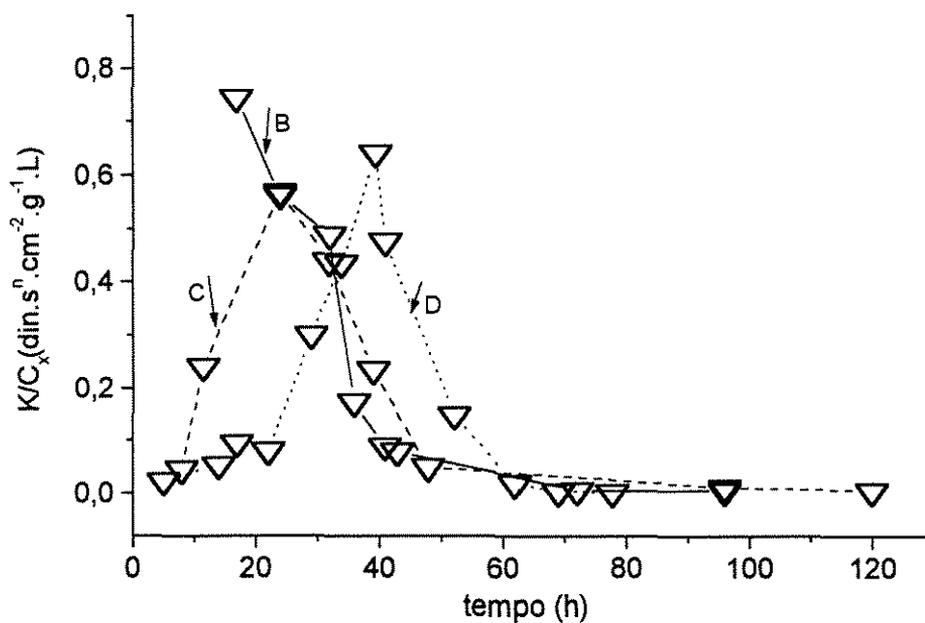


Figura 5.39: K/C_x em função do tempo. Ensaios B (—), C (- - -) e D (.....).

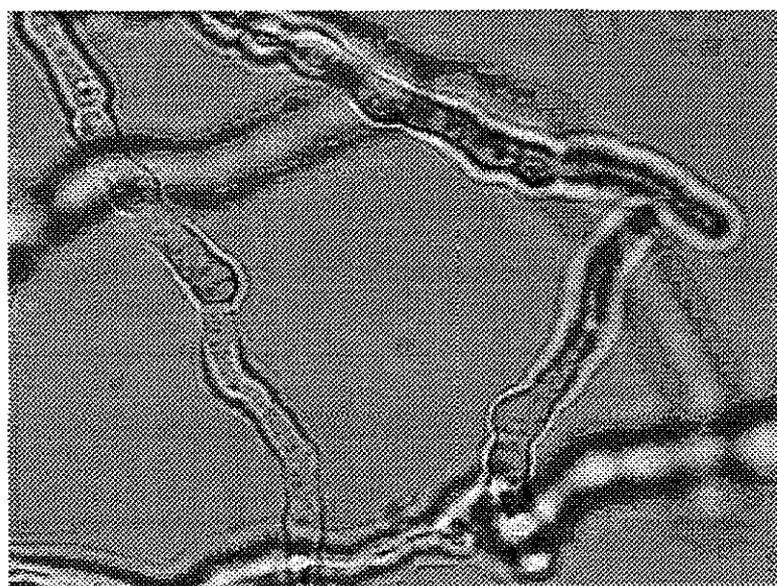
As tabelas 5.23 a 5.25 e figuras 5.29 a 5.37, referentes à caracterização reológica dos caldos fermentativos dos ensaios B, C e D, apresentaram resultados semelhantes. O comportamento do índice de consistência (K) e do índice de escoamento (n) verificados nestes ensaios indicaram pseudoplasticidade dos caldos fermentativos. Como pode ser visto, o índice de consistência apresentou valores distintos ao longo do processo e o índice de escoamento se manteve menor que a unidade, caracterizando desta forma os caldos como fluidos pseudoplásticos, de acordo com o modelo da lei da potência. A figura 5.38 apresenta uma comparação do índice de escoamento obtido para os três ensaios.

Na figura 5.39, observa-se comportamento da relação K/C_X para os três ensaios e concluiu-se que o ensaio em batelada apresentou um atraso em relação aos ensaios em batelada alimentada. Este fato deve ser atribuído aos diferentes volumes reacionais iniciais entre os ensaios em batelada alimentada e em batelada.

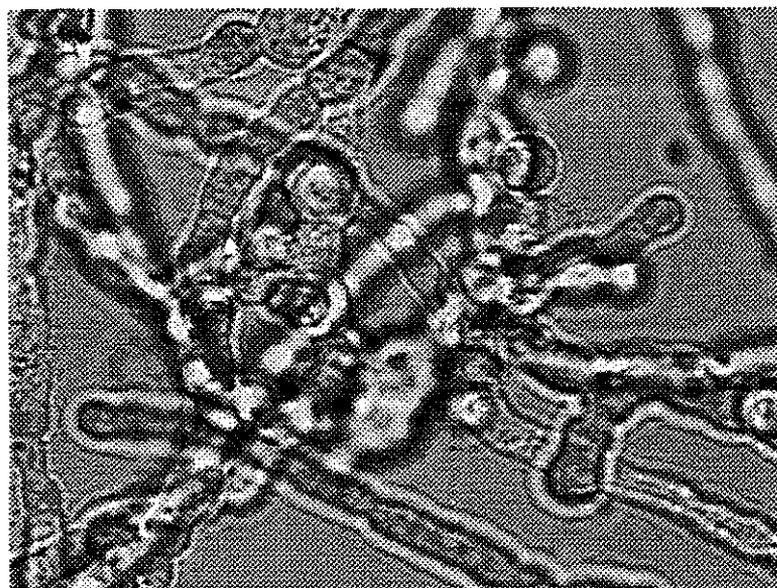
No bioprocessamento em batelada alimentada, a relação K/C_X ocorreu mais rapidamente do que em batelada. A suplementação nesses ensaios foi realizada a partir de aproximadamente 30 horas, momento em que K/C_X caiu rapidamente. Este fenômeno está associado com a influência da diferenciação morfológica do fungo.

As figuras 5.40 a 5.42 mostram as fases de diferenciação morfológica do fungo em tempos distintos da fermentação.

Quando a relação K/C_X começa a subir exponencialmente, as células passam de filamentos de hifas para hifas inchadas e septadas. Quando K/C_X começa a decair, as células tomam a forma de fragmentos de hifas inchadas elipsoidais e esféricas, e ao final do processo, observa-se preferencialmente a presença de conídios e artrosporos. O comportamento de K/C_X ao longo das fermentações com *C. acremonium* é determinado por esta diferenciação morfológica.



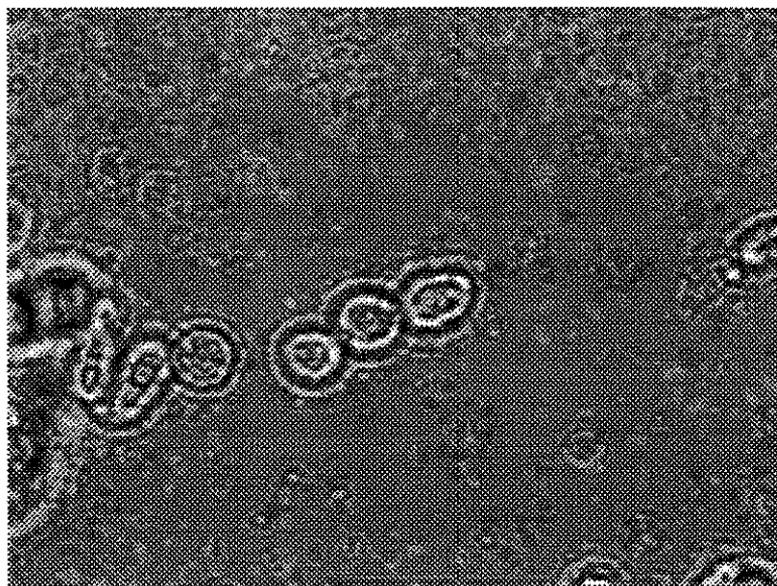
(a)

10 μ m

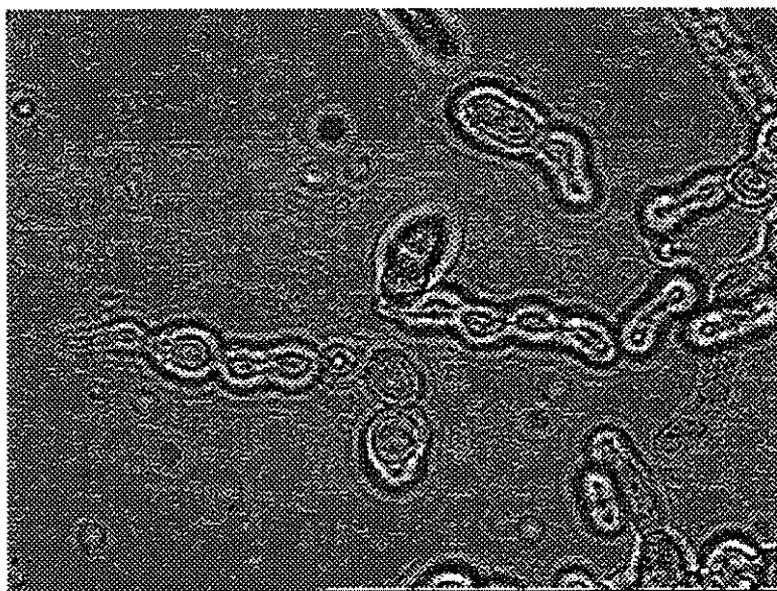
(b)

10 μ m

Figura 5.41: Fotomicrografias de células fúngicas em 37 horas de fermentação. Fragmentos intumescidos de hifas, típicos da fase em que a concentração celular tende a um valor constante coincidindo com o aumento exponencial do índice de consistência do caldo e com o esgotamento da glicose. Foram utilizadas em (a) e (b) objetiva 100X/1,30.



(a)

10 μ m

(b)

10 μ m

Figura 5.42: Fotomicrografias de células fúngicas em 120 horas de fermentação. Artrosporos e conídios típicos do fase de formação da cefalosporina. Foi utilizada em (a) e (b) objetiva 100X/1,30.

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados e discussões realizadas durante este trabalho, pode-se concluir que:

A linhagem *C. acremonium* ATCC 48272 apresentou comportamento diáuxico e preferência pelos açúcares glicose, frutose e sacarose, em ordem decrescente.

Na fase de germinação e inóculo, a linhagem apresentou resultados melhores na presença de glicose para o crescimento celular, atingindo valores na ordem de 29 g/L.

Na fase de fermentação para a obtenção de antibiótico, o meio constituído por glicose e sacarose na relação 27:36 forneceu produtividades específicas superiores tais como $Pr_{esp14} = 0,180 \text{ mg}_{CPC}/\text{g}_{cél.}\cdot\text{h}$, $Pr_{esp34} = 0,137 \text{ mg}_{CPC}/\text{g}_{cél.}\cdot\text{h}$, $Pr_{esp24} = 0,068 \text{ mg}_{CPC}/\text{g}_{cél.}\cdot\text{h}$.

O emprego da mistura frutose e glicose na fase de germinação não superou o uso da glicose na obtenção de uma maior produtividade específica.

O ensaio em batelada em biorreator tipo tanque com glicose e sacarose 27:36 forneceu maior produtividade específica.

Entre os ensaios em batelada alimentada realizados, o ensaio com a relação glicose/sacarose 81:100 e de maior vazão suplementar forneceu produtividade específica superior, porém inferior à do ensaio em batelada.

A relação proposta por Demain 27:36 de glicose e sacarose não se apresentou como a melhor relação em outros modos de operação que não o de batelada.

A produtividade específica obtida no tanque agitado para ensaio em batelada foi superior à obtida no processo de frascos agitados.

O emprego de viscosímetro de cilindros concêntricos possibilitou a caracterização reológica dos caldos, concluindo-se que em todos os ensaios as suspensões apresentaram comportamento pseudoplástico.

Os parâmetros da Lei da Potência (K e n) obtidos descreveram satisfatoriamente a característica reológica do caldo, onde n se manteve menor que a unidade e o comportamento exibido pelo K pode ser associado a diferenciação morfológica do fungo nas diversas etapas.

7. SUGESTÕES

Em função dos resultados obtidos, em continuidade ao presente trabalho, sugerimos que:

- estudos com ensaios em batelada alimentada devem ser realizados empregando meio suplementar contendo sacarose previamente hidrolisada, de forma que seja possível controlar a velocidade de consumo de substrato.
- o desenvolvimento de correlações que envolvam os coeficientes de transporte de massa, parâmetros reológicos e parâmetros relativos à diferenciação morfológica.
- sejam realizadas fermentações em tanque agitado utilizando meio complexo buscando aumentar a produtividade.
- sejam realizados experimentos para a aquisição de mais dados experimentais nas ~40 horas iniciais do processo fermentativo com *C. acremonium* C-10 para buscar uma correlação entre o índice de consistência, propriedades reológicas do caldo e diferenciação morfológica, a exemplo do que foi feito por Schmidell *et al.* (1994), Olsvik e Kristiansen (1994) e Li *et al.* (1995) *apud* Queiroz *et al.* (1997).
- realizar o estudo em frascos agitados (ensaio 14) por um tempo de 120 h.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.P., LODER, P.B. Cephalosporin C. In: FLYNN, E.H. **Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology**. New York : Academic Press, 1972. p. 2-24.
- AJAYI, O., KEMBLOWSKI, Z., KRISTIENSEN, B., LARSEN, V.F. On-line rheometer for the monitoring of polymer fermentations: operating conditions. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 8, p. 583-588, 1991.
- ALLEN, D.G., ROBINSON, C.W. The influence of “slip” on rheological measurements on a mycelial broth of *Aspergillus niger*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 506, p. 589-599, 1987.
- ALLEN, G.D., ROBINSON, C.W. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. **Chemical Engineering Science**, v. 45, n. 1, p. 37-48, 1990.
- ARAÚJO, M.L.G.C. **Estudo cinético do processo de produção de cefalosporina c com células livres e imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 4822**. São Carlos : UFSCar, 1996. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química.
- ARAÚJO, M.L.G.C., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O., GOMES, L.M.S. Estudo da influência de diferentes carboidratos no processo de produção de cefalosporina C pelo *Cephalosporium acremonium*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO Y NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 3., Santiago. Santiago : Universidad de Chile, 1993. p. 180

- ARAÚJO, M.L.G., SANTANA, M.H.A., OLIVEIRA, R.P., HOKKA, C.O., GOMES, L.M.S. Estudo cinético do processo de produção de cefalosporina C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 10., São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1994. v. 2, p. 1240-1245.
- BADINO JR., A.C. **Contribuição ao estudo de agitação e aeração de caldos de fermentação penicilínica.** São Carlos. : UFSCar, 1991. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química.
- BADINO JR., A.C. **Reologia, consumo de potência e transferência de oxigênio em cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL-3112.** São Paulo : USP, 1987. 182 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica.
- BALLICA, R., RYU, D.D.Y. Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids. **Biotechnology Bioengineering**, v. 42, p. 1181-1189, 1993.
- BALLICA, R., RYU, D.D.Y., POWELL, R.L., OWEN, D. Rheological properties of plant cell suspensions. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 5, p. 413-420, 1992.
- BAYER, T.H., HEROLD, T.H., HIDDESEN, R., SCHÜGERL, K. On-line monitoring of media components during the production of cephalosporin C. **Analytica Chimica Acta**, v. 190, p. 213-219, 1986.
- BAYER, T., HEROLD, T. HOLZHAUER, K., ZHOU, W., SCHÜGERL, K. Comparison of cephalosporin C production in stirred-tank and airlift tower loop reactors. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 589, p. 665-669, 1990.
- BAYER, T., ZHOU, W., HOLZHAUER, K., SCHÜGERL, K. Investigations of cephalosporin C production in an airlift tower loop reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 26-33, 1989.

- BEHMER, C.J., DEMAIN, A.L. Further studies on carbon catabolite regulation of beta-lactam antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Current Microbiology**, v. 8, p. 107-114, 1983.
- BENNINGTON, C.P.J., KERESKES, R.J., GRACE, J.R. The yield stress of fibre suspensions. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 68, p. 748-757, 1990.
- BEROVIC, M., CIMERMAN, A., STEINER, W., KOLOINI, T. Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 579-581, 1991.
- BIRD, R.B., STEWART, W.E., LIGHTFOOT, E.N. **Fenômenos de transporte**. Editorial Reverté, 1964. 650 p.
- BLANCH, H.W., BHAVARAJU, S.M. Non-Newtonian fermentation broths: rheology and mass transfer. **Biotechnology Bioengineering**, v. 18, p. 745-790, 1976.
- BONGENAAR, J.J.T.M., KOSSEN, N.W.F., METZ, B., MEIJBOOM, F.W. A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. **Biotechnology Bioengineering**, v. 15, p. 201-206, 1973.
- BYCROFT, B.W., SHUTE, R.E. Chemistry and biosynthesis of penicillins and cephalosporins. In: MOSS, M.O. **Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium***. New York : Plenum Press, 1987.
- CALDERBANK, P.H., MOO-YONG, M.B. The prediction of power consumption in the agitation of non-newtonian fluids. **Transactions of the Institute of Chemical Engineering**, v. 37, p. 22-33, 1959.
- CALTRIDER, P.G., NISS, H.F. Role of methionine in cephalosporin synthesis. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 746-752, 1966.

- CHARLES, M. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 8, p. 1-62, 1978.
- CLARIDGE, C.A., JOHNSON, D.L. A specific bio-assay for cephalosporin C in fermentation broths. **Antibiotic Agents and Chemotherapy**, p. 682-686, 1962.
- CURTIS, W.R., EMERY, A.H. Plant cell suspension culture rheology. **Biotechnology Bioengineering**, v. 42, p. 520-526, 1993.
- DEMAIN, A.L. Biology of antibiotic formation. In: VANDAME, E.J. **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York : Marcel Dekker, 1984. p. 33-42.
- DEMAIN, A.L. Formation of beta-lactam antibiotics. **Revista di Biologia**, v. 76, n. 2, p. 225-244, 1983.
- DEMAIN, A.L. Over production of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 1, p. 113-142, 1971.
- DEMAIN, A.L., KENNEL, Y.M. Resting-cell studies on carbon-source regulation of beta-lactam antibiotic biosynthesis. **Journal of Fermentation Technology**, v. 56, n. 4, p. 323-328, 1978.
- DEMAIN, A.L., NEWKIRK, J.F., HENDLIN, D. Effect of methionine, norleucine, and lysine derivatives on cephalosporin C formation in chemically defined media. **Journal of Bacteriology**, n. 85, p. 339-344, 1963.
- DENNEN, D.W., CARVER, D.D. Sulfatase regulation and antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 175-181, 1969.

- DREW, S.W., DEMAIN, A.L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 343-356, 1977.
- DREW, S.W., DEMAIN, A.L. Methionine control of cephalosporin C formation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 15, p. 743-754, 1973.
- GAVRILESCU, M., ROMAN, R.V., EFIMOV, V. Rheological behaviour of some antibiotic biosynthesis liquids. **Acta Biotechnology**. v. 12, p. 383-396, 1992.
- GOMES, L.M.S., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O. Bioprocesso em batelada para produção de cefalosporina C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 11., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1996a. p. 1514-1519.
- GOMES, L.M.S., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O. Caracterização reológica de caldo de fermentação para produção de cefalosporina C. SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 4., Maringá. **Anais...** Maringá, 1994. p. 277-285.
- GOMES, L.M.S., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O. Specific productivity and rheological characterization of batch and fed-batch cephalosporin C production bioprocess. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 101-108, 1997a. (prelo)
- GOMES, L.M.S., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O. Studies on batch and fed-batch bioprocesses: specific productivities and rheological characterization of fungi fermentations. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 19., Colorado. **Proceedings...** Colorado, 1997b. p. 89.
- GOMES, L.M.S., SANTANA, M.H.A., HOKKA, C.O., GONÇALVES, L.L. Caracterização reológica de caldos de fermentação fúngica: processo semi-contínuo e descontínuo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11., São Carlos. **Anais...** São Carlos : UFSCar, 1996b. p. 174-179.

- GROVE, D.C., RANDALL, W.A. **Assay methods of antibiotics**. New York : Medical Encyclopedia, 1955. Chap. 2.
- HEIM, J., SHEN, Y-Q., WOLFE, S., DEMAIN, A.L. Regulation of isopenicillin n synthetase and deacetoxycephalosporin c synthetase by carbon source during the fermentation of *Cephalosporium acremonium*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 232-236, 1984.
- HEROLD, T., BAYER, T., SCHÜGERL, K. Cephalosporin C production in a stirred tank reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 168-173, 1988.
- HILGENDORF, P., HEISER, V., DIEKMANN, H., THOMA, M. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 247-251, 1987.
- HUBER, F.M., TIETZ, A.J. Defined media strategies for the biosynthesis of cephalosporin C. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 6, p. 385-390, 1983.
- KEMBLOWSKI, Z., BUDZYNSKI, P., OWEZARZ, P. On-line measurements of rheological properties of fermentation broth. **Rheologica Acta**, v. 29, p. 588-593, 1990.
- KEMBLOWSKI, Z., KRISTIENSEN, B. Rheometry of fermentations liquids. **Biotechnology Bioengineering**, v. 28, p. 1474-1483, 1986.
- KIM, E.Y., YOO, Y.J. Analysis of Broth Rheology with Cell Morphology in *Cephalosporium* Fermentation. **Biotechnology Techniques**, v. 6, n. 6, p. 501-506, 1992.
- KITANO, K., KINTAKA, K., NAKAO, Y. Comparative study of methionine effect on cephalosporin production by various fungi. **Journal of Fermentation Technology**, v. 55, n. 1, p. 27-36, 1977.

- KITANO, K., KINTAKA, K., SUZUKI, S., KATAMOTO, K., NARA, K., NAKAO, Y. Screening of microorganisms capable of producing beta-lactam antibiotics. **Journal of Fermentation Technology**, v. 53, n. 6, p. 327-338, 1975.
- KRISTIANSEN, B., OLSVICK, E.S. Rheology of filamentous fermentations broths. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 207-209, 1993.
- KUENZI, M.T. Regulation of cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose. **Archives of Microbiology**, v. 128, p. 78-83, 1980.
- KWON, G.S., MOON, S.H., HONG, S.D., LEE, H.M., HEEN, T.I., OH, H.M., YOON, B.D. Rheological properties of extracellular polysaccharide, pestan, produced by *Pestalotiopsis sp.* **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 12, p. 1465-1470, 1996.
- LANDON, R.S., LAW, R.C.S. WEBB, C. Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) as a possible tool for control. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 215-257, 1993.
- LEMKE, P.A., NASH, C.H. Mutations that affect antibiotic synthesis by *Cephalosporium acremonium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 255-259, 1972.
- LEWANDOWSKA, M., PASZEWSKI, A. Regulation of sulfur amino acids metabolic enzymes in *Cephalosporium acremonium* strains differing in antibiotic production. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 36, n. 1/2, p. 39-51, 1987.
- LEWANDOWSKA, M., PASZEWSKI, A. Sulphate and methionine as sulphur sources for cysteine and cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 37, n. 1, p. 17-26, 1988.

- MANTLE, P.G. Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*. In: MOSS, M.O. **Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium***. New York : Plenum Press, 1987. v. 1, c. 6, p. 161-242.
- MARTIN, J., DEMAIN, A.L. Fungal development and metabolite formation. In: SMITH, J.E., BARRY, D.R. **The filamentous fungi**. London : Edward Arnold, 1978. v. 3, p. 426-450.
- MATSUMURA, M., IMANAKA, T., YOSHIDA, T., TAGUCHI, H. Effect of glucose and methionine consumption rates on cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 56, n. 4, p. 345-353, 1978.
- MATSUMURA, M., IMANAKA, T., YOSHIDA, T., TAGUCHI, H. Modeling of cephalosporin C production and its application to fed-batch culture. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, n. 2, p. 115-123, 1981.
- MATSUMURA, M., IMANAKA, T., YOSHIDA, T., TAGUCHI, H. Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 58, n. 3, p. 197-204, 1980a.
- MATSUMURA, M., IMANAKA, T., YOSHIDA, T., TAGUCHI, H. Regulation of cephalosporin C production by endogenous methionine in *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 58, n. 3, p. 205-214, 1980b.
- METZ, B., KOSSEN, N.W.F., Van SUIJDAM, J.C. The rheology of mould suspensions. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 11, p. 103-156, 1979.
- METZNER, A.B., FEEHS, R.H., RAMOS, H.L., OTTO, R.E., TUTHILL, J.D. Agitation of viscous newtonian and non-newtonian fluids. **AICHE Journal**, v. 7, n. 1, p. 3-9, 1961.

- MOSS, M.O., Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. In: TEDERBY, J.F. *Penicillium and Acremonium*. New York : Plenum Press, 1987. v. 1, p. 37-71.
- NASH, C.H., HUBER, F.M. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Applied Microbiology*, v. 22, n. 1, p. 6-10, 1971.
- NASH, C.H., MEHTA, R.J., BALL, C. *Cephalosporium acremonium*: a β -lactam antibiotic producing microbe. In: DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. **Biology of industrial microorganisms**. London : Butterworths, 1985. p. 433-448.
- O'CALLAGHAN, C.H., MUGGLETON, P.W. Biological reactions of cephalosporins and penicillins. In: FLYNN, E.H. **Cephalosporins and penicillins - chemistry and biology**. New York : Academic Press, 1972. p. 439-490.
- OLSVIK, E.S., KRISTIANSEN, B. Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnology Bioengineering*, v. 40, p. 1293-1299, 1992a.
- OLSVIK, E.S., KRISTIANSEN, B. On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnology Bioengineering*, v. 40, p. 375-387, 1992b.
- OLSVIK, E.S., KRISTIANSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnology Advances*, v. 12, p. 1-39, 1994.
- OLSVIK, E., TUCKER, K. G., THOMAS, C. R., KRISTIANSEN, B. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnology Bioengineering*, v. 42, p. 1046-1052, 1993.

- PEDERSEN, A.G., NIELSEN, M.B., NIELSEN, J., VILLADSEN, J., HASSAGER, O. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 41, p. 162-164, 1993.
- QUEIROZ, M.C.R., FACCIOTTI, M.C.R., SCHMIDELL, W. Rheological changes of *Aspergillus awamori* broth during amyloglucosidase production. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 2, p. 167-170, 1997.
- REUSS, M., DEBUS, D., ZOLL, G. Rheological properties of fermentation fluids. **The Chemical Engineer**, p. 233-236, 1982.
- ROBERTS, M., BOYCE, B.C. Principles of biological assay. In: NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W. **Methods in microbiology**. New York : Academic Press, 1972. v. 7A, p. 153-190.
- RODRIGUES, J.A.D. **Contribuição ao estudo cinético da fase de crescimento do processo de produção de penicilina**. São Carlos : UFSCar, 1992. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química. 114 p.
- RUOHANG, W., WEBB, C. Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 1, p. 55-58, 1995.
- SAWADA, Y., BALDWIN, J.E., SINGH, P.D., SOLOMON, N.A., DEMAIN, A.L. Cell-free cyclization of delta-(L-alfa-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 3, p. 465-470, 1980.
- SCHMIDELL, W., FACHINI, E.R., FACCIOTTI, M.C.R., KILIKIAN, B.V. Rheological behavior studies on *Aspergillus sp.* submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 25, n. 2, p. 126-128, 1994.

- SCHÜGERL, K. Comparison of the performances of stirred tank and airlift tower loop reactor - fermentor comparison for phenoxymethylpenicillin production by *Penicillium chrysogenum*, cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum* and tetracyclin production by *Streptomyces aureofaciens*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 251-256, 1990.
- SCHÜGERL, K. On-line analysis and control of production of antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 213, p. 1-9, 1988.
- SCHÜGERL, K., BAYER, T., NIEHOFF, J., MÖLLER, J., ZHOU, W. **Influence of cell environment on the morphology of molds and the biosynthesis of antibiotics in bioreactors**. *Bioreactor Fluid Dynamics*, J., E₃, p. 229-243, 1988.
- SHEN, Y-Q., HEIM, J., SOLOMOM, N.A., WOLFE, S., DEMAIN, A.L. Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 5, p. 503-511, 1984.
- SHEN, Y-Q., WOLFE, S., DEMAIN, A.L. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. **Bio/Technology**, v. 4, p. 61-63, 1986.
- SHI, Y., RYU, D.D.Y., BALLICA, R. Rheological properties of mammalian cell culture suspensions: hybridoma and hela cell lines. **Biotechnology Bioengineering**, v. 41, p. 745-754, 1993.
- SMITH, A. Cephalosporins. In: MOO-YONG, M. **Comprehensive biotechnol.** Oxford : Pergamon Press, 1985. v. 3. p. 165-185.
- SMITH, J., KRISTIANSEN, B. Extended summaries biotechnology group meeting recent developments in fungal bioprocessing. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 203-222, 1993.

- SOLOMONS, G.L. **Materials and methods in fermentation**. London : Academic Press, 1969. v. 1.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, p. 19-23, 1952.
- SUIJDAM Van, J.C., METZ, B. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. **Biotechnology Bioengineering**, v. 23, p. 111-148, 1981.
- TUCKER, K.G., KELLY, T., DELGRAZIA, P., THOMAS, C.R. Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 353-359, 1992.
- WARREN, S.J., KESHAVARZ-MOORE, E., SHAMLOU, P.A., LILLY, M.D. Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. **Biotechnology Bioengineering**, v. 45, p. 80-85, 1995.
- WICK, W.E. Biological evaluation. In: FLYNN, E.H. **Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology**. New York : Academic Press, 1972. p. 497-529.
- ZANCA, D.M., MARTIN, J.F. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. **The Journal of Antibiotics**, v. 36, n. 6, p. 700-708, 1983.
- ZHANG, J., WOLFE, S., DEMAINE, A.L. δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 12, p. 1746-1750, 1987.
- ZHANG, J., WOLFE, S., DEMAINE, A.L. Phosphate repressible and inhibitable beta-lactam synthetases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 242-247, 1988.

ZHONG, J.J., SEKI, T., KINOSHITA, S.I., YOSHIDA, T. Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 40, p. 1256-1262, 1992.