

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE CISALHAMENTO MÉDIA
EM BIORREATOR CONVENCIONAL TIPO TANQUE
AGITADO E AERADO**

Alexandre Campesi

**São Carlos – SP
2007**

**AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE CISALHAMENTO MÉDIA
EM BIORREATOR CONVENCIONAL TIPO TANQUE
AGITADO E AERADO**

Alexandre Campesi

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

**São Carlos – SP
2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C195av

Campesi, Alexandre.

Avaliação da velocidade de cisalhamento média em
biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado /
Alexandre Campesi. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
85 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2007.

1. Engenharia bioquímica. 2. Biorreator convencional. 3.
Fluido não Newtoniano. 4. *Streptomyces clavuligerus*. I.
Título.

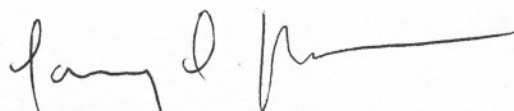
CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ALEXANDRE CAMPESI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM
12 DE MARÇO DE 2007.


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Orientador, PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas
FCFRP/USP

**Dedico este trabalho à minha
mãe pela força, apoio e
incentivo em todos os
momentos de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr. pela orientação, paciência, solicitude e confiança, sem as quais este trabalho não se realizaria.

À minha avó, aos meus tios Dora, Marlene e Antônio e a minha prima Larissa pela amizade, atenção, paciência, compreensão e auxílio nestes anos de muita luta.

Ao Álvaro, Sheila e Marcel pela atenção, companheirismo, amizade e além de tudo paciência com minhas dúvidas.

Aos demais amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCAR: Luciana, Carol, Clóvis, Amadeus e Juliana.

À Daniela pelo apoio, incentivo e compreensão durante este período de aprendizado.

À CNPQ pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Em processos bioquímicos, a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) no meio reacional é uma importante variável no projeto e operação de biorreatores. O cisalhamento pode resultar em dano às células e aos microrganismos, levando à perda de viabilidade e até mesmo ao rompimento celular e à morte microbiana. No presente trabalho propôs-se uma metodologia para quantificar a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado com 4 litros de volume útil, através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), variando-se as condições de operação, no caso frequência de rotação do impelidor (N: 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar} : 0,50 e 1,00 vvm). Utilizaram-se cinco diferentes soluções de glicerol e água destilada como fluidos Newtonianos, e seis diferentes soluções de goma xantana como fluidos não-Newtonianos. As viscosidades dinâmicas (μ) para as soluções de glicerol e as constantes reológicas (K e n) para as soluções de goma xantana foram obtidas a 28°C em reômetro de cilindros concêntricos a partir de reogramas. Com base nos resultados obtidos, propôs-se uma correlação para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N), das propriedades reológicas dos fluidos (K e n) e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). A correlação obtida para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) mostrou-se adequada para estimativas de $\dot{\gamma}_m$, pois os valores estimados aproximaram-se de outros estimados por diferentes correlações propostas na literatura. Numa segunda etapa, realizaram-se quatro cultivos com *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado a 0,50 vvm e agitado em 700, 800, 900 e 1000 rpm. Valores de variáveis do processo como o índice de consistência (K), índice de comportamento de escoamento (n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (C_{Glic}) e quantidade de dióxido de carbono produzido (\dot{V}_{CO_2}) foram obtidos ao longo dos cultivos. Observou-se que o índice de consistência (K), índice de comportamento de escoamento (n) e a concentração celular (Cx) sofreram variações decorrentes das condições de cisalhamento impostas aos cultivos. Por fim, com base em resultados experimentais de literatura, determinou-se a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função do tempo para cultivos de *S. clavuligerus* em biorreator convencional, a 600, 800 e 1000 rpm e vazão específica de alimentação de ar de 0,50 vvm, empregando-se a metodologia proposta, os resultados obtidos foram mais consistentes, pois se utilizou valores experimentais de k_{La} obtidos pelo balanço gasoso.

Evaluation of the Average Shear Rate in Stirred and Aerated Tank Bioreactor

ABSTRACT

In biochemical processes, shear rate ($\dot{\gamma}$) in the system is an important variable on design and operation of bioreactors. Shear can result in damage to the cells and the microorganisms, taking to the viability loss and even to the cellular breaking and the microbial death. In the present work was proposed a methodology to quantify average shear rate ($\dot{\gamma}_{av}$) in stirred bioreactor with a 4 L working volume, through volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}), varying the operating conditions, as the impeller rotational speed (N: 600, 700, 800, 900 and 1000 rpm) and the specific air flow rate (Φ_{ar} : 0.50 and 1.00 vvm). Five different glycerol solutions and distilled water were utilized as Newtonian fluids and six different xantham gum solutions were utilized as non-Newtonian fluids. Dynamic viscosity (μ) of the glycerol solutions and rheological parameters (K, n) for the xantham gum solutions, were determined at 28°C from rheograms using a digital concentric-cylinders rheometer. Based on the obtained results, a correlation for average shear rate ($\dot{\gamma}_{av}$) as function of the impeller rotational speed (N), rheological parameters (K, n) and volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) was proposed. The correlation obtained for the average shear rate ($\dot{\gamma}_{av}$) showed appropriate to estimate $\dot{\gamma}_{av}$, because the estimated values approximated of others values described in literature for another correlations. In a second stage, four cultivations of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 was realized in a stirred bioreactor, aerated 0.50 vvm and agitated in 700, 800, 900 and 1000 rpm. Process variable values, as consistency index (K), flow index (n), cellular concentration (Cx), glicerol concentration (C_{Glic}) and \dot{V}_{CO_2} produced ag of the cultivations were evaluated. It was observed that the consistency index (K), flow index (n) and cellular concentration (Cx) varied due to shear conditions imposed to the cultivations. Finally, based on experimental literature results, average shear rate ($\dot{\gamma}_{av}$) was determined in function of the time for cultivation of *S. clavuligerus* in stirred bioreactor for 600, 800 and 1000 rpm and specific air flow rate (Φ_{ar}) of 0.50 vvm, using the proposed methodology, the obtained values were more consistent, because the experimental values of k_{La} were obtained by gaseous balance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Biorreatores airlift de circulação interna com aeração no interior do tubo concêntrico e coluna de bolhas (Chisti, 1989).....	5
Figura 2.2. Biorreator tipo tanque agitado e aerado.....	7
Figura 2.3. Escoamento radial do fluido para impelidor o tipo turbina com seis pás planas em biorreator com chicanas.....	7
Figura 2.4. Resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (Bailey e Ollis, 1986).....	9
Figura 2.5. Tensão de cisalhamento (τ) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para líquidos Newtonianos e não-Newtonianos.....	16
Figura 2.6. Comparação das várias correlações para velocidade de cisalhamento máxima e média ($\dot{\gamma}_{\max}$ e $\dot{\gamma}_m$) em biorreator convencional mecanicamente agitado (Chisti, 2001).....	25
Figura 2.7. Imagem de <i>Streptomyces clavuligerus</i> (Pinto, 2002).....	26
Figura 3.1. Dimensões do biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado empregado nas duas etapas do trabalho.....	29
Figura 3.2. Apresentação esquemática dos equipamentos utilizados na presente etapa do trabalho (1-analisador de oxigênio, 2-eletrodo de oxigênio, 3-fluxômetro de massa, 4-válvula de pressão e 5-medidor de pressão).....	30
Figura 3.3. Representação esquemática do procedimento experimental.....	38
Figura 4.1. Dados experimentais de $k_L a$ a 0,50 vvm em função da frequência de rotação do impelidor (N) para fluidos Newtonianos.....	42

Figura 4.2. Dados experimentais de k_{La} a 1,00 vvm em função da frequência de rotação do impelidor (N) para fluidos Newtonianos.....	43
Figura 4.3. Valores experimentais de k_{La} em função dos valores calculado pela equação 4-1 para fluidos Newtonianos aerados a 0,50 vvm.....	44
Figura 4.4. Dados experimentais de k_{La} em função do k_{La} calculado pela equação 4-2 para fluidos Newtonianos aerados a 1,00 vvm.....	45
Figura 4.5. Dados experimentais de k_{La} em função de N para fluidos não-Newtonianos a 0,50 vvm.....	47
Figura 4.6. Dados experimentais de k_{La} em função de N para fluidos não-Newtonianos a 1,00 vvm.....	47
Figura 4.7. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) a 0,50 vvm para soluções de goma xantana em diferentes concentrações.....	48
Figura 4.8. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) a 1,00 vvm para soluções de goma xantana em diferentes concentrações.....	49
Figura 4.9. Valores experimentais da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{exp}$) em função dos valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{calc}$) calculada pela equação 4-8 para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 vvm.....	51
Figura 4.10. Valores experimentais da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{exp}$) em função dos valores de velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{calc}$) calculada pela equação 4-8 para a vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) a 1,00 vvm.....	52
Figura 4.11. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}).....	53

Figura 4.12. Comparação entre os valores das velocidades de cisalhamento média (γ_m) e máxima (γ_{max}) obtidas por diferentes correlações.....	57
Figura 4.13. Resultados do cultivo C1 (700 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.....	60
Figura 4.14. Resultados do cultivo C2 (800 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.....	61
Figura 4.15. Resultados do cultivo C3 (900 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.....	62
Figura 4.16. Resultados do cultivo C4 (1000 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.....	63
Figura 4.17. Dióxido de carbono produzido em função do tempo.....	64
Figura 4.18. Perfis do índice de consistência normalizado (\bar{K}) para os cultivos C1, C2, C3 e C4.....	65
Figura 4.19. Perfis da concentração celular normalizada (\bar{C}_x) em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.....	66
Figura 4.20. Perfis do índice de escoamento normalizado (\bar{n}) para os cultivos C1, C2, C3 e C4.....	67
Figura 4.21. Perfis da concentração de glicerol normalizado (\bar{C}_{glic}) para os cultivos C1, C2, C3 e C4.....	68
Figura 4.22. Perfis do índice de consistência normalizado multiplicado pela concentração celular normalizada para os cultivos C1, C2, C3 e C4.....	69
Figura 4-23. Perfis da velocidade de cisalhamento média (γ_m) em função do tempo para os quatro cultivos.....	71
Figura 4.24. Perfis do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos BC1, BC2 e BC3.....	73
Figura 4.25. Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.....	75

Figura 4.26. Perfis do índice de escoamento do fluido (n) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.....	76
Figura 4.27. Perfis da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores da constante de proporcionalidade (k).....	21
Tabela 2.2. Correlações para a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) em biorreator mecanicamente agitado (Chisti, 2001).....	24
Tabela 3.1. Viscosidade dinâmica dos fluidos Newtonianos.....	28
Tabela 3.2. Propriedades reológicas dos fluidos não-Newtonianos.....	29
Tabela 3.3. Condições de operação dos cultivos C1, C2, C3 e C4.....	33
Tabela 3.4. Composição do meio de cultura de reativação (MR).....	34
Tabela 3.5. Composição do meio de cultura de inóculo (MI).....	34
Tabela 3.6. Composição do meio de cultura de produção (MP).....	35
Tabela 4-1: Valores de k_{La} em biorreator convencional operado com fluido Newtoniano em diferentes condições de agitação e aeração.....	41
Tabela 4.2. Valores de k_{La} em função da vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) e da frequência de rotação do impelidor (N) para diferentes fluidos não-Newtonianos (soluções de goma xantana).....	46
Tabela 4.3. Valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) e o número de Reynolds (Re) para as vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm.....	55
Tabela 4.4. Valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) para as correlações presentes na literatura e para as correlações propostas no presente trabalho.....	57
Tabela 4.5. Condições de operação dos cultivos BC1, BC2 e BC3.....	73

NOMENCLATURA

a	área interfacial de troca de massa (m^{-1});
a, b, c	parâmetros de ajuste da equação 3-2 para a determinação do $k_L a$;
C	concentração do oxigênio na fase líquida ($g\ O_2/m^3$);
C_e	concentração de oxigênio dissolvido lido pelo eletrodo de oxigênio ($mmol.L^{-1}$);
C_s	concentração do oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio da fase gasosa ($g\ O_2/m^3$);
C_x	concentração celular (g/L);
\bar{C}_{glic}	concentração de glicerol normalizado (-);
\bar{C}_x	concentração celular normalizada (-);
d, e, f	parâmetros de ajuste da equação 4-3 para a determinação do $k_L a$;
d_i	diâmetro do impelidor (m);
d_T	diâmetro do tanque ou coluna (m);
D_{O_2}	difusividade do oxigênio ($m^2.s^{-1}$);
g	aceleração da gravidade ($m.s^{-2}$);
k	constante de proporcionalidade das equações 2-14 e 2-15;
k_e	constante de atraso do eletrodo (s^{-1});
$k_L a$	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (s^{-1});
k_L	coeficiente de transferência de massa da película líquida (m/h);
k_1, a_1 e b_1	constantes de ajuste da correlação de Cooper <i>et. al.</i> (1944);
k_2, a_2, b_2, c_2	constantes de ajuste da correlação de Ryu e Humphrey (1972);
K	índice de consistência ($kg.m^{-1}.s^{n-2}$);

\bar{K}	índice de consistência normalizado (-);
n	índice de escoamento do fluido (-);
\bar{n}	índice de escoamento normalizado (-);
n_{O_2}	fluxo de oxigênio ($\text{g O}_2/\text{m}^2.\text{h}$);
N	freqüência de rotação do impelidor (s^{-1});
N_{O_2}	velocidade volumétrica de transferência de oxigênio ($\text{g O}_2/\text{m}^3.\text{h}$);
$\dot{n}_{CO_2 s}$	vazão molar de CO_2 na saída do biorreator (mol/h);
$\dot{n}_{O_2 e}$	vazão molar de O_2 na entrada do biorreator (mol/h);
$\dot{n}_{O_2 s}$	vazão molar de O_2 na saída do biorreator (mol/h);
P	pressão ambiente (atm);
P_1, P_2, P_3	parâmetros de ajuste da equação 4-10 para a determinação da velocidade de cisalhamento média;
P_{gm}	potência transmitida por cada impelidor (W);
P_g/V	consumo de potência para o sistema gaseificado por unidade de volume (W/m^3);
Φ_{ar}	vazão específica de alimentação de ar (vvm);
R	constante universal dos gases ($\text{atm}.\text{m}^3.\text{K}^{-1}.\text{kmol}^{-1}$);
RQ	quociente respiratório (-)
Sc	número de Schmidt (-);
t	tempo (s);
T	temperatura (K);
v_s	velocidade superficial do gás ($\text{m}.\text{s}^{-1}$);
V_m	volume de líquido dividido pelo número de impelidores (m^3);
$x_{CO_2 s}$	fração molar de CO_2 na saída do biorreator;

$x_{N_2 S}$	fração molar do nitrogênio;
$x_{CO_2 S}$	fração molar de CO na saída do biorreator;
W	largura da pá do impelidor (m);

Letras Gregas

ε	índice de consistência normalizado multiplicado pela concentração celular normalizada (-).
σ	tensão superficial do meio ($N.m^{-1}$);
σ_w	tensão superficial da água ($N.m^{-1}$);
ν_{ap}	viscosidade cinemática aparente;
τ	tensão de cisalhamento ($kg.m^{-1}.s^{-2}$);
τ_e	tempo de resposta do eletrodo (s);
μ	viscosidade do líquido ($kg.m^{-1}.s^{-1}$);
μ_{ap}	viscosidade do aparente (Pa.s);
μ_L	viscosidade do líquido (Pa.s);
ρ	densidade do meio ($kg.m^3$);
ρ_L	densidade do líquido ($kg.m^{-3}$);
$\dot{\gamma}$	velocidade de cisalhamento (s^{-1});
$\dot{\gamma}_{max}$	velocidade de cisalhamento máxima (s^{-1});
$\dot{\gamma}_m$	velocidade de cisalhamento média (s^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	VII
NOMENCLATURA.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biorreatores.....	4
2.1.1. Biorreatores pneumáticos.....	4
2.1.2. Biorreatores tipo tanque agitado e aerado.....	6
2.2. Transferência de oxigênio em bioprocessos.....	8
2.2.1. Correlações para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).....	12
2.3. Características reológicas de caldo de fermentação.....	15
2.4. Cisalhamento em biorreatores.....	19
2.5. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Metodologia para avaliação da velocidade de cisalhamento média (γ_m).....	28
3.1.1. Fluidos.....	28
3.1.2. Equipamentos utilizados.....	29
3.1.3. Medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).....	30
3.1.4. Metodologia experimental.....	31

3.2. Influência das condições de cisalhamento em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	33
3.2.1. Microrganismo.....	33
3.2.2. Meios de cultura.....	33
3.2.3. Equipamentos utilizados.....	35
3.2.3.1. Autoclaves.....	35
3.2.3.2. Câmara asséptica.....	35
3.2.3.3. Ultrafreezer.....	36
3.2.3.4. Mesa incubadora rotativa.....	36
3.2.3.5. Reômetro.....	36
3.2.3.6. Analisador de dióxido de carbono.....	36
3.2.3.7. Controlador de pH.....	36
3.2.3.8. Biorreator de bancada.....	36
3.2.3.9. Cromatógrafo.....	37
3.2.4. Metodologia experimental.....	37
3.2.5. Metodologias analíticas.....	38
3.2.5.1. Análise de glicerol.....	38
3.2.5.2. Caracterização reológica do caldo de cultivo.....	39
3.2.5.3. Determinação da concentração celular.....	39
3.2.5.4. Determinação da vazão molar de dióxido de carbono.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Avaliação da velocidade de cisalhamento em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado.....	41

4.1.1. Comparação entre as correlações propostas e as fornecidas pela literatura para velocidade de cisalhamento média (γ_m).....	56
4.2. Influência das condições de cisalhamento nas variáveis do cultivo.....	59
4.2.1. Comparação das variáveis de processo obtidas durante os cultivos.....	64
4.3. Determinação da velocidade de cisalhamento média (γ_m) em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> utilizando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).....	73
5. CONCLUSÕES.....	79
6. CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Biorreatores são equipamentos usados para converter matérias-primas em produtos utilizando microrganismos, células animais ou vegetais ou enzimas. Existem diversos tipos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos, destacando o convencional tipo tanque agitado e aerado e os pneumáticos “Airlift” e coluna de bolhas. Segundo Schügerl (1987), os biorreatores têm por objetivo proporcionar as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios) para que microrganismos e células cresçam e produzam os metabólitos de interesse.

Na indústria de fermentação, os biorreatores tipo tanque agitado e aerado são os mais empregados. Algumas das razões são por assegurar correta distribuição dos nutrientes (homogeneização), um mínimo de morte celular resultante da adição de ácido e base concentrados para o controle de pH, uma confiável transferência de calor para o controle da temperatura e de massa para o suprimento de oxigênio, e por fim a facilidade no aumento de escala (Charles, 1985).

Os caldos fermentativos contendo microrganismos filamentosos exibem freqüentemente um comportamento pseudoplástico (não-Newtoniano), que pode ser descrito pelo modelo da lei de potência. Este comportamento exerce um profundo efeito no desempenho do biorreator, afetando o padrão de mistura e os processos de transferência de massa e energia (Gavrilescu *et al.*, 1993).

Em fermentações aeróbias, o crescimento celular eleva a demanda de oxigênio do processo e simultaneamente a viscosidade aparente do caldo (μ_{ap}), que acaba por dificultar a transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida, reduzindo o coeficiente volumétrico de

transferência de oxigênio (k_{La}), o que pode limitar o crescimento do microrganismo e a própria biossíntese do produto desejado (Badino *et al.*, 2001).

O aumento na viscosidade aparente (μ_{ap}) do caldo fermentativo em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado pode ser parcialmente compensado pelo aumento no valor das condições operacionais (N e Φ_{ar}), a fim de manter um adequado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Contudo, segundo Merchuk e Gluz (1999), altas frequências de rotação do impelidor (N) levam à alta velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) próxima à ponta do impelidor, que pode causar mudanças morfológicas irreversíveis no microrganismo, mudanças reológicas no caldo fermentativo, e por consequência, prejudicam o desempenho do cultivo.

Devido à importância da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) no projeto e operação de biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, a literatura descreve várias correlações para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) (Metzner e Otto, 1957; Calderbank e Moo-Young, 1959; Bowen, 1986; Kelly e Gigas, 2003; Pérez *et al.*, 2006) e para a velocidade de cisalhamento máxima ($\dot{\gamma}_{max}$) (Wichterle *et al.*, 1984; Bowen, 1986; Robertson e Ulbrecht, 1987) para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

É esperado que a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado seja dependente, além da frequência de rotação do impelidor (N), das propriedades reológicas do fluido no biorreator, em particular dos índices de consistência e do comportamento de escoamento (K e n) (Robertson e Ulbrecht, 1987). A maioria das correlações para a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) proposta na literatura, tanto para biorreatores convencionais quanto para biorreatores pneumáticos, são apresentadas em função apenas da frequência de rotação do impelidor (N) ou da vazão de alimentação de ar (Q), respectivamente. De acordo com Chisti (2001), a velocidade de cisalhamento é dependente da capacidade de

transferência de quantidade de movimento do fluido, ou seja, da densidade e da viscosidade do mesmo.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado utilizando soluções de glicerol como fluidos Newtonianos e soluções de goma xantana como fluido não-Newtoniano e propor uma correlação para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) e das propriedades reológicas (K e n) do fluido de trabalho. Numa segunda etapa, o objetivo foi analisar quatro cultivos de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 no mesmo sistema em diferentes condições de operação e avaliar as alterações em diferentes variáveis do processo, decorrentes das condições de cisalhamento impostas aos cultivos.

Pretende-se com este trabalho contribuir para o desenvolvimento dos processos fermentativos, promovendo avanços no entendimento da influência da velocidade de cisalhamento em processos fermentativos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorreatores

Biorreatores são equipamentos usados para converter matérias-primas em produtos utilizando microrganismos, células animais ou vegetais ou enzimas. Os biorreatores proporcionam as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios) para que microrganismos e células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (Schügerl, 1987).

Embora existam muitos modelos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos, os usualmente empregados em cultivos de microrganismos e células, independentemente da escala são os convencionais tanques agitados e aerados e os pneumáticos coluna de bolhas e airlift.

2.1.1 Biorreatores pneumáticos

Os biorreatores pneumáticos são caracterizados pela ausência de sistemas de agitação, o que simplifica a construção e a operação, além de apresentar considerável economia de energia (Chisti e Moo-Young, 1989). Por outro lado, exigem vazões de aeração mais elevadas, a fim de manter um bom nível de agitação e transferência de oxigênio. Atualmente, os biorreatores pneumáticos são empregados com maior frequência em processos fermentativos e no tratamento de águas residuárias, entre outras operações.

Dentre os vários tipos de biorreatores pneumáticos, onde a homogeneização do meio e a aeração são realizadas pela injeção de ar ou por outros gases através de um aspersor localizado na base, destacam-se os biorreatores airlift e coluna de bolhas.

Há uma grande variedade de configurações de biorreatores airlift na literatura, contudo dois principais tipos têm recebido várias aplicações: o de circulação externa e o de circulação interna (Chisti e Moo-Young, 1989).

Segundo Onken e Weiland (1983), o biorreator airlift de circulação externa possui dois tanques cilíndricos e paralelos conectados no topo e na base. Normalmente os dois tanques têm diâmetros diferentes, o tanque de maior diâmetro tem a base gaseificada pelo aspersor. Já o airlift de circulação interna é composto de um tanque cilíndrico, geralmente com um tubo concêntrico. A injeção de gás pode ocorrer na região anular, entre o tubo concêntrico e a parede da coluna ou no interior do tubo concêntrico. Ainda, segundo os autores, o airlift com tubo concêntrico é o mais investigado e usado em processos industriais e em escala de bancada.

Na Figura 2.1 encontram-se os desenhos esquemáticos de biorreatores airlift e coluna de bolhas.

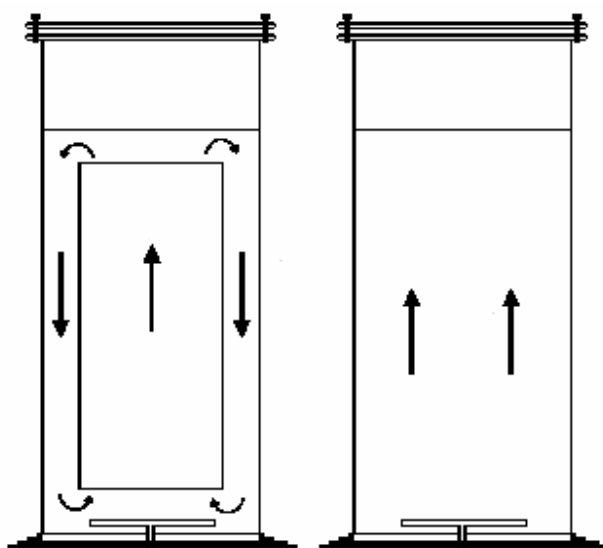


Figura 2.1. Biorreatores airlift de circulação interna com aeração no interior do tubo concêntrico e coluna de bolhas (b) (Chisti e Moo-Young, 1989).

Uma importante característica dos biorreatores airlift é a razão altura/diâmetro. Na indústria essa razão pode ser superior a 10 (Onken e Weiland, 1983). Salientando que esses

equipamentos costumam ser projetados com altura bem superior ao seu diâmetro, a fim de permitir maior tempo de residência do gás em contato com o líquido e proporcionar maior transferência de massa.

2.1.2 Biorreatores tipo tanque agitado e aerado

O biorreator tipo tanque agitado e aerado, entendido como convencional ou padrão, normalmente apresenta altura do líquido próxima ao diâmetro do tanque, sendo agitado por um ou mais impelidores tipo turbina com 6 pás planas, diâmetro igual a $\frac{1}{3}$ do diâmetro do tanque. Com o objetivo de evitar a formação de vórtice, usa-se um sistema de quatro chicanas, diametralmente opostas, apresentando cada uma largura de $\frac{1}{10}$ ou $\frac{1}{12}$ do diâmetro do tanque. Apesar de existir a descrição desse tanque padrão, na verdade raramente verifica-se uma perfeita obediência a essas relações geométricas, observando-se, freqüentemente, tanques com altura maior do que o diâmetro, turbinas de dimensões superiores à indicada, além do emprego de múltiplas turbinas. Justifica-se tal procedimento pela necessidade de se obter maior homogeneização do conteúdo do biorreator e transferência de oxigênio mais efetiva (Schmidell., 2001).

De acordo com Charles (1985), na indústria de fermentação os biorreatores tipo tanque agitado e aerado são os mais utilizados. Algumas das razões são por assegurar correta distribuição dos nutrientes, um mínimo de morte celular resultante da adição de ácido e base concentrados para o controle de pH, uma confiável transferência de calor para o controle da temperatura e de massa para o suprimento de oxigênio, e por fim a facilidade no aumento de escala.

A Figura 2.2 ilustra um biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado.

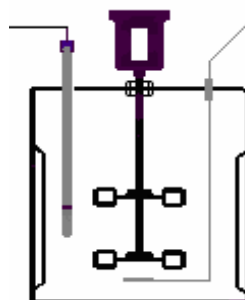


Figura 2.2. Biorreator tipo tanque agitado e aerado.

A agitação deste tipo de biorreator tem várias funções, como a transferência de quantidade de movimento, calor, massa e homogeneização do meio reacional. A necessidade de otimização de tarefas específicas no biorreator convencional resultou na elaboração de diferentes tipos de impelidores, sendo mais utilizado o impelidor turbina de seis pás planas ou tipo Rushton, com o aspensor de gás localizado abaixo do impelidor (Asenjo e Merchuk, 1994).

O impelidor turbina de pás planas apresenta fluxo de descarga na direção radial, ou seja, na direção das paredes do tanque, como está ilustrado na Figura 2.3.

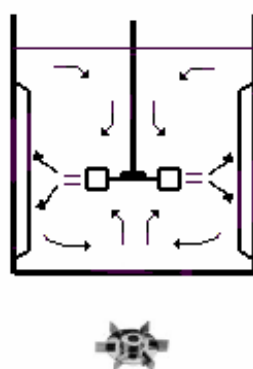


Figura 2.3. Escoamento radial do fluido para o impelidor tipo turbina com seis pás planas em biorreator com chicanas.

Tendo em vista a importância da agitação do meio, é de se esperar que quanto maior for a agitação maior será a transferência de oxigênio, fator limitante em processos fermentativos

envolvendo o cultivo de microrganismos aeróbios. No entanto, quanto maior a agitação maior será o cisalhamento celular que pode causar mudanças morfológicas irreversíveis no microrganismo, e por consequência, mudanças reológicas no caldo fermentativo, influenciando desta forma a biossíntese do produto de interesse (Merchuk e Gluz, 1999).

De fato, os processos biológicos aeróbios necessitam de um correto dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio para se ter um aceitável cisalhamento celular e uma transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida que atenda a demanda pela respiração da população celular.

2.2 Transferência de oxigênio em bioprocessos

Em bioprocessos que envolvem o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, o oxigênio apresenta-se como um elemento essencial no suprimento de energia para o metabolismo celular. Está envolvido no processo de reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise, no ciclo de Krebs e no processo de produção de energia “química”, transformando as moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamental para o crescimento celular, síntese de produtos, transporte e outras atividades celulares (Schmidell, 2001).

Um problema peculiar relacionado ao oxigênio em bioprocessos é sua baixa solubilidade quando comparado a outros nutrientes presentes em meios fermentativos, associado em alguns casos, à grande demanda provocada por altas velocidades globais de respiração celular. Concentrações de oxigênio dissolvido em torno de 10 mg/L, comuns nos meios de cultivo, chegam a ser de 1.000 a 10.000 vezes menores que as concentrações de outros componentes do meio como a glicose (Bailey e Ollis, 1986).

Além da baixa solubilidade, o processo de transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, no caso de cultivos de bactérias ou fungos filamentosos, enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos mais viscosos à medida que o cultivo evolui. Ainda, com o aumento da concentração celular e o aumento da velocidade específica de respiração celular, o consumo global de oxigênio aumenta.

É possível, portanto, imaginar que existam muitas resistências associadas ao transporte de oxigênio da fase gasosa até o seu consumo final. Na Figura 2.4 busca-se ilustrar algumas dessas possíveis resistências.

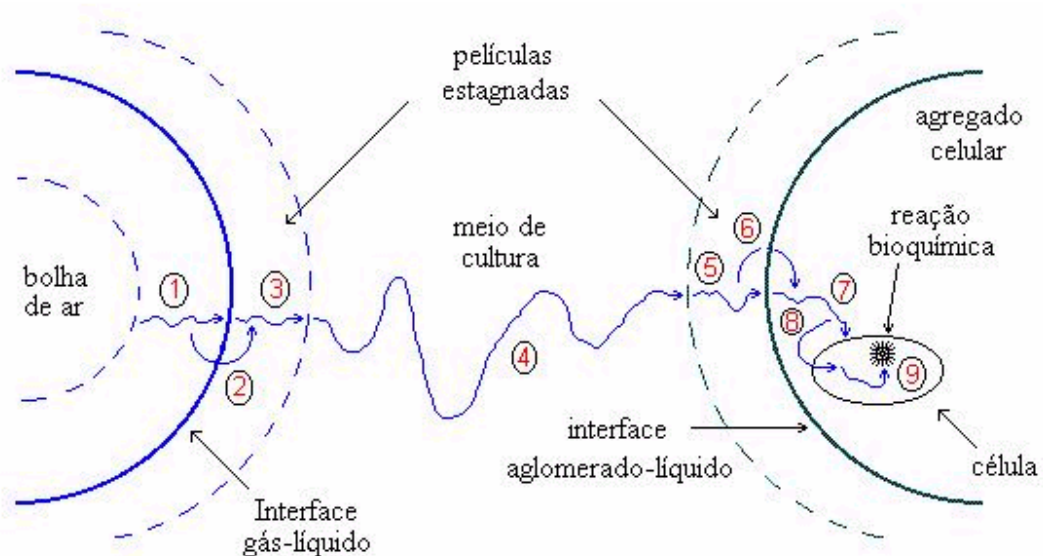


Figura 2.4. Resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (Bailey e Ollis, 1986).

A Figura 2.4 descreve um caminho típico para a transferência de oxigênio da bolha de gás até a célula. Há nove principais resistências: (R_1) difusão através da película estagnada de gás; (R_2) interface gás-líquido; (R_3) difusão através da película estagnada de líquido; (R_4) difusão de oxigênio até a célula; (R_5) difusão através da película líquida em torno da célula; (R_6) passagem pela interface caldo agregado celular; (R_7) difusão através do agregado celular; (R_8) passagem pela membrana celular; (R_9) difusão no citoplasma.

De acordo com Kargi e Moo-Young (1985), a resistência global à transferência de oxigênio é igual à soma das resistências individuais e suas magnitudes dependem da hidrodinâmica da bolha e da fase líquida, da composição e reologia do caldo fermentativo, concentração e atividade celular, assim como do fenômeno interfacial gás-líquido.

Tendo em vista as diminutas dimensões das células, bem como a área exposta ao meio líquido, às resistências (R_5), (R_6) e (R_7) podem ser desprezadas. Quando o caldo é submetido a condições de agitação e aeração suficientemente altas, a resistência (R_4) é desprezada. Considerando as dimensões celulares e os mecanismos de assimilação de oxigênio pelos microrganismos, pode-se também desprezar as resistências (R_8) e (R_9).

As resistências (R_1), (R_2) e (R_3) fazem parte de um mecanismo bem conhecido de transferência de massa em sistemas gás-líquido. A teoria mais amplamente usada para descrever a transferência de massa em sistemas gás-líquido foi desenvolvida por Whitman (1923) e baseia-se na hipótese das duas películas estagnadas (Kargi e Moo-Young, 1985).

O equacionamento da velocidade de transferência de oxigênio do ar para o meio levando em consideração a teoria das duas películas está representado na equação 2-1.

$$n_{O_2} \cdot a = N_{O_2} = k_L a \cdot (C_s - C) \quad \text{Eq. 2-1}$$

onde:

- n_{O_2} fluxo de oxigênio ($\text{g O}_2/\text{m}^2 \cdot \text{h}$);
- a área interfacial de troca de massa (m^{-1});
- N_{O_2} velocidade volumétrica de transferência de oxigênio ($\text{g O}_2 / \text{m}^3 \cdot \text{h}$);
- $k_L a$ coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});
- C_s concentração do oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio da fase gasosa (p_g) ($\text{g O}_2/\text{m}^3$);

C concentração do oxigênio na fase líquida ($\text{g O}_2/\text{m}^3$);

Caso o sistema não esteja em estado estacionário em termos de fluxo de oxigênio, mas esteja ocorrendo uma variação na concentração de oxigênio dissolvido (C) no tempo (t), pode-se escrever:

$$n_{\text{O}_2} \cdot a = \frac{dC}{dt} \quad \text{Eq. 2-2}$$

Deste modo, tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C_s - C) \quad \text{Eq. 2-3}$$

Para avaliar a transferência de oxigênio em biorreatores recorre-se, portanto, a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), sob diferentes condições operacionais e de geometria do sistema.

Segundo Kargi e Moo-Young (1985), o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) é um importante parâmetro usado para comparar a capacidade de transferência de oxigênio de vários biorreatores aeróbios.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) pode ser visto como o produto de dois termos: o coeficiente de transferência de massa (k_L) e a área interfacial de troca de massa (a). Ambos dependem de uma série de variáveis que são agrupadas em três categorias: (1) propriedades do líquido, tais como densidade, difusividade e tensão superficial; (2) propriedades dinâmicas do líquido, tais como os parâmetros reológicos; (3) intensidade de agitação e fluxo de alimentação de gás. Em geral, as variáveis do grupo 1 não modificam drasticamente o coeficiente volumétrico de transferência de massa ($k_L a$). As variáveis dos grupos 2 e 3, entretanto, alteram significativamente.

Há diversas metodologias para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) em biorreatores na ausência de microrganismos, destacando-se os métodos do sulfito, dinâmico e o da pressão, sendo este último muito bem descrito no trabalho publicado por Blazej *et al.* (2004), que consiste em mudar abruptamente a pressão no interior do biorreator acarretando simultaneamente uma mudança na concentração de oxigênio dissolvido no meio reativo.

Um importante ponto a ser levado em conta na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) é a dinâmica do eletrodo de oxigênio. O atraso na resposta do eletrodo de oxigênio faz necessário discernir a resposta do eletrodo da concentração real de oxigênio. Portanto, uma análise correta no comportamento do eletrodo deve ser feita para se ter uma determinação confiável do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Sabendo-se como é possível determinar experimentalmente os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) durante um processo fermentativo, surge naturalmente o interesse em correlacionar os valores deste coeficiente de transferência com as condições de agitação e aeração empregadas, objetivando sempre o suprimento da demanda por oxigênio ($Q_{O_2.X}$).

2.2.1 Correlações para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).

Sendo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) um importante parâmetro avaliado no desempenho e no aumento de escala dos biorreatores, vários autores desenvolveram correlações que estabelecem uma dependência deste parâmetro com as condições operacionais do biorreator e de fatores dimensionais do sistema.

Um dos trabalhos mais clássicos nessa direção foi proposto por Cooper *et al.* (1944). O modelo relaciona o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) com o consumo de

potência para o sistema gaseificado por unidade de volume do meio (P_g/V) e com a velocidade superficial do gás (v_s):

$$k_L a = K_1 \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{a_1} \cdot v_s^{b_1} \quad \text{Eq. 2-4}$$

As constantes K_1 , a_1 e b_1 variam de acordo com a geometria do sistema, com as características reológicas do fluido e das faixas experimentais de frequência de rotação (N) e vazão de alimentação de ar (Q). Embora a princípio tenha sido desenvolvida para fluidos diferentes que caldos de fermentação, este tipo de correlação tem sido empregado com sucesso em sistemas fermentativos (Badino *et al.*, 2001).

Na literatura encontram-se também correlações com pequenas variações daquela proposta por Cooper *et al.* (1944), que levam em conta outros fatores importantes, procurando melhor correlacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio com propriedades físicas do caldo.

Ryu e Humphrey (1972) trabalhando com caldos de fermentação, observaram que a viscosidade aparente (μ_{ap}) também influencia o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) e propuseram a seguinte correlação:

$$k_L a = K_2 \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{a_2} \cdot v_s^{b_2} \cdot \mu_{ap}^{c_2} \quad \text{Eq. 2.5}$$

Da mesma forma que a correlação de Cooper *et al.* (1944), as constantes K_2 , a_2 , b_2 , c_2 dependem da geometria do sistema e da faixa de operação das variáveis. Embora de natureza simples a correlação proposta por Ryu e Humphrey (1972) apresenta um poder de ajuste da mesma ordem que outras correlações de natureza bem mais complexa como as baseadas na técnica de análise dimensional.

Outro exemplo de correlação, entre as existentes na literatura, é proposta por Zlokarnik (1978) usando números adimensionais, que busca relacionar a dependência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) com parâmetros geométricos do sistema, propriedades físico-químicas do fluido e condições operacionais. A equação 2-6 representa a correlação proposta por Zlokarnik (1978):

$$k_L a \cdot \left(\frac{Q}{V_m} \right)^{-1} = 0,30 \cdot \left[\left(\frac{P_{gm}}{Q} \right)^* \right]^{0,35} \cdot Sc^{-0,30} \cdot \left(\frac{\sigma}{\sigma_w} \right)^{-0,50} \quad \text{Eq. 2-6}$$

P_{gm} potência transmitida por cada impelidor (W);

V_m volume de líquido dividido pelo número de impelidores (m^3);

Sc número de Schmidt (adimensional);

Q vazão de alimentação de ar ($m^3 \cdot s^{-1}$);

σ tensão superficial do meio ($N \cdot m^{-1}$);

σ_w tensão superficial da água ($N \cdot m^{-1}$);

Os adimensionais que aparecem na equação 2-6 são representados por:

$$\left(\frac{P_{gm}}{Q} \right)^* = \left(\frac{\left(\frac{P_{mg}}{Q} \right)}{\rho \cdot (g \cdot \mu_{ap})^{2/3}} \right) \quad \text{Eq. 2-7}$$

onde:

ρ densidade do meio ($kg \cdot m^{-3}$);

g aceleração da gravidade ($m \cdot s^{-2}$);

$$Sc = \frac{v_{ap}}{D_{O_2}} \quad \text{Eq. 2-8}$$

onde:

D_{O_2} difusividade do oxigênio ($m^2 \cdot s^{-1}$);

ν_{ap} viscosidade cinemática aparente ($m^2 \cdot s^{-1}$);

A correlação proposta por Zlokarnik (1978) difere das demais correlações pelo fato de a variável P_{gm} representar a potência transmitida por impelidor, o que possibilita a utilização desta correlação em sistemas com múltiplos impelidores.

Cabe ressaltar que as correlações para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) representadas pela equações 2-4, 2-5 e 2-6, apesar de serem válidas para biorreatores de distintas geometrias, devem ser utilizadas com devida cautela. Na realidade, a melhor condição para o levantamento de correlações reside na utilização das condições específicas do processo fermentativo em desenvolvimento.

2.3 Características reológicas do caldo de fermentação

No projeto de biorreatores e em estudos de estratégias de controle das variáveis de agitação e aeração, há a necessidade de um bom conhecimento do comportamento reológico do caldo de fermentação ao longo do tempo de cultivo.

Sabe-se que durante um processo fermentativo ocorrerem alterações significativas no caldo fermentativo, podendo este passar de Newtoniano à condição de fluido não-Newtoniano, como é o caso de processos fermentativos envolvendo o cultivo de fungos e bactérias filamentosas em geral. Portanto, é bem evidente que essa situação exige um tratamento especial, e o caso mais freqüente é o surgimento de um comportamento pseudoplástico.

Na Figura 2.5 estão ilustradas as possíveis formas de variação da tensão de cisalhamento (τ) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), para alguns fluidos típicos.

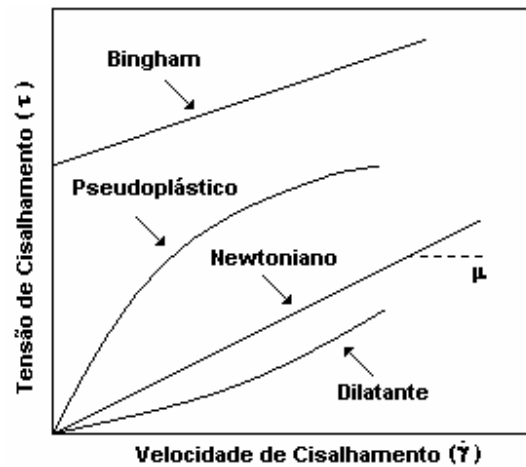


Figura 2.5. Tensão de cisalhamento (τ) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para líquidos Newtonianos e não-Newtonianos.

Os fluidos Newtonianos, a maioria dos caldos fermentativos contendo microrganismos unicelulares (Charles e Wilson, 1994), caracterizam-se por apresentar uma proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento (τ) e a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), como observado na Figura 2.5, sendo esta constante de proporcionalidade definida como a viscosidade dinâmica do fluido, ou seja:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Eq. 2-9}$$

onde:

- τ tensão de cisalhamento ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$);
- μ viscosidade dinâmica do líquido ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$);
- $\dot{\gamma}$ velocidade de cisalhamento (s^{-1});

A viscosidade de um fluido Newtoniano é independente da velocidade de cisalhamento e da tensão de cisalhamento, no entanto, dependem da temperatura, composição, pH, e outros parâmetros físico-químicos (Charles e Wilson, 1994).

Um tipo de fluido não-Newtoniano é o fluido pseudoplástico. O modelo matemático para o comportamento pseudoplástico mais adequado é a lei de potência, ou seja:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 2-10}$$

K índice de consistência (Pa.sⁿ);

n índice de comportamento do escoamento (adimensional);

O fluido é caracterizado como pseudoplástico quando o índice de comportamento do escoamento (n) é menor que 1. Se índice de comportamento é maior que 1 o fluido é denominado dilatante. O fluido é caracterizado como Newtoniano quando índice de comportamento for igual a 1, neste caso, o índice de consistência (K) é a própria viscosidade do fluido.

Para fluidos não-Newtonianos que seguem a lei da potência, a equação 2-11 expressa a viscosidade aparente (μ_{ap}):

$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Eq. 2-11}$$

Como se pode observar, a viscosidade aparente (μ_{ap}) depende da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), sendo que para fluidos pseudoplásticos, ela diminui com o aumento de $\dot{\gamma}$, valor este imposto pelo impelidor.

Calderbank e Moo-Young (1959), observaram que é possível definir para um fluido pseudoplástico uma relação entre a viscosidade aparente, as propriedades reológicas do fluido (K e n) e a frequência de rotação do impelidor (N), expressa por:

$$\mu_{ap} = \left(\frac{K}{10 \cdot N^{1-n}} \right) \cdot \left(\frac{(6 \cdot n + 2)}{n} \right)^n \quad \text{Eq. 2-12}$$

Warren *et al.* (1995) examinaram as reologias dos caldos e as morfologias de três actinomicetos (*Saccharopolyspora erythraea*, *Actinomadura roseorufa* e *Streptomyces rimosus*) em cultivos submersos. Os caldos foram caracterizados como pseudoplásticos. Os índices de comportamento de escoamento (n) decresceram durante os cultivos, mantendo-se entre 0,20 e

0,25. Já os índices de consistência (K) aumentaram com a concentração celular (Cx), apresentando um decréscimo ao final dos cultivos. Os comprimentos médios das hifas situaram-se na faixa de 15-25 μm , não se alterando acentuadamente com as variações nos índices de consistência (K).

Badino (1997) descreveu os dados reológicos experimentais em termos do modelo da lei de potência, durante os cultivos de *Aspergillus awamori* para produção de glicoamilase. O índice de consistência (K) foi convenientemente relacionado com a concentração celular (Cx) e com as condições de operação, representadas pela frequência de rotação do impelidor (N) e pela vazão de alimentação de ar (Q).

$$K = 0,32 \cdot Cx^{3,29} \cdot N^{-4,33} \cdot Q^{-0,39} \quad \text{Eq. 2-13}$$

Observa-se através da equação 2-13 que aumentando a frequência de rotação do impelidor (N) ou a vazão de alimentação de ar (Q) resulta na diminuição do índice de consistência (K). Por outro lado, um aumento na concentração celular (Cx) tem como consequência o aumento desse parâmetro reológico.

Segundo Kawase e Kumagai (1991) a variação na reologia de caldos fermentativos gera incertezas no projeto, no aumento de escala e na operação do biorreator. Infelizmente, há confusão e desentendimento neste campo. Embora exista na literatura um grande número de dados experimentais e várias correlações para hidrodinâmica e transferência de massa e energia para fluidos não-Newtonianos, raramente estas publicações concordam uma com a outra. Isto é indiscutivelmente devido às definições racionais da viscosidade aparente ou da velocidade de cisalhamento.

Ainda, segundo os mesmos autores, o modelo da lei de potência não pode descrever as curvas de escoamento durante toda a escala da velocidade de cisalhamento, uma vez que os

parâmetros do modelo dependem da faixa da velocidade de cisalhamento usada para determinar as propriedades reológicas. Na determinação dos parâmetros da lei de potência, n e K , a obtenção da curva de escoamento deveria ser realizada na escala da velocidade de cisalhamento, na qual o biorreator é operado, geralmente regime turbulento.

O fato apresentado anteriormente claramente trás á tona a importância de se obter a definição apropriada da viscosidade aparente ou da velocidade de cisalhamento. Isto incapacita o desenvolvimento de correlações empíricas para a estimativa dos parâmetros de projeto e para determinar apropriadamente parâmetros reológicos em fluidos não-Newtonianos.

2.4 Cisalhamento em biorreatores

Em processos bioquímicos, a velocidade de cisalhamento do meio reacional é uma importante variável no projeto e operação do biorreator. O excesso de cisalhamento pode resultar em dano às células e aos microrganismos, levando a perda de viabilidade e até mesmo ao rompimento celular e à morte microbiana. No entanto, certo grau de cisalhamento é necessário para atingir suficiente transferência de massa e energia (Contreras *et al.*, 1999).

Células animais e de plantas em cultura são mais susceptíveis do que os microrganismos às condições de operação do biorreator. Na célula animal falta a parede celular rígida presente nos microrganismos, além disso, a célula animal é maior, então é mais sensível à tensão mecânica. As células de planta têm parede celulósica rígida, mas são maiores do que os microrganismos e, portanto também sensíveis às condições de operação do biorreator (Merchuk e Gluz, 1999).

De acordo com Chisti (2001), nos biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado a velocidade de cisalhamento varia com a velocidade de rotação do impelidor (N). A magnitude

da variação depende da localização específica no tanque, do tipo de impelidor, da velocidade de agitação e das propriedades do fluido.

Nos tanques com impelidor tipo turbina com pás planas, a velocidade de cisalhamento é máxima próxima à ponta do impelidor, e diminui quando se distancia deste (Robertson e Ulbrecht, 1987). Por isso, diferentes valores de velocidades de cisalhamento devem ser identificados, incluindo velocidade de cisalhamento média (γ_m) e velocidade de cisalhamento máxima (γ_{max}).

Para os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, a velocidade de cisalhamento média (γ_m) entre a extremidade do impelidor e a parede do tanque é função da frequência de rotação do eixo do impelidor (N), conforme proposto por Metzner e Otto (1957):

$$\gamma_m = k \cdot N \quad \text{Eq. 2-14}$$

A equação 2-15, proposta por Calderbank e Moo-Young (1959) é uma forma modificada da equação 2-14:

$$\gamma_m = k \cdot \left(\frac{4 \cdot n}{3 \cdot n + 1} \right)^{\frac{n}{n-1}} \cdot N \quad \text{Eq. 2-15}$$

onde:

- n índice de escoamento do fluido (-);
- k constante de proporcionalidade (-);

A constante de proporcionalidade (k) depende do tipo de impelidor e da geometria do sistema, além do tipo de líquido não-Newtoniano (Schmidell, 2001).

A Tabela 2.1 apresenta os valores da constante k para várias geometrias de impelidores (Badino, 1997).

Tabela 2.1. Valores da constante de proporcionalidade (k).

Referência	K	Descrição
Metzner e Otto (1957)	13	Impelidor tipo turbina de 6 pás planas, fluidos pseudoplásticos
Calderbank e Moo-Young (1959)	10	Impelidores tipo turbina de 6 pás planas, palheta de 2 pás planas e hélice, fluidos pseudoplásticos e de Bingham
	$12,8 \cdot (d_i/d_t)^{0,5}$	Fluidos dilatantes
Metzner (1961)	11,6	1 impelidor tipo turbina de 6 pás planas $0,052 \leq d_i(m) \leq 0,204$ e $1,3 \leq d_t/d_i \leq 5,5$
	11,4	2 impelidor tipo turbina de 6 pás planas $0,100 \leq d_i(m) \leq 0,305$ e $1,023 \leq d_t/d_i \leq 3,5$

Wichterle *et al.* (1984) propuseram uma correlação para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos para a velocidade de cisalhamento máxima ($\dot{\gamma}_{\max}$) na ponta do impelidor tipo turbina com pás planas.

$$\dot{\gamma}_{\max} = N \cdot (1 + 5,3 \cdot n)^{1/n} \left(\frac{N^{2-n} \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{K} \right)^{1/(1+n)} \quad \text{Eq. 2-16}$$

onde:

- ρ_L densidade do líquido ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
- d_i diâmetro do impelidor (m);
- K índice de consistência do fluido ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$);

Bowen (1986) sugeriu uma correlação para velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), para fluido Newtoniano em um tanque agitado mecanicamente por um impelidor tipo turbina com seis pás planas.

$$\dot{\gamma}_m = 4,2 \cdot N \cdot \left(\frac{d_i}{d_T} \right)^{0,3} \cdot \left(\frac{d_i}{W} \right) \quad \text{Eq. 2-17}$$

onde:

- d_i diâmetro do impelidor (m);
- W largura da pá do impelidor (m);
- d_T diâmetro do tanque ou coluna (m);

Bowen (1986) propôs também uma correlação para a velocidade de cisalhamento máxima ($\dot{\gamma}_{\max}$), a partir da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), para fluido Newtoniano em um tanque agitado mecanicamente por um impelidor tipo turbina com seis pás planas.

$$\dot{\gamma}_{\max} = 9,7 \cdot N \cdot \left(\frac{d_i}{d_T} \right)^{0,3} \cdot \left(\frac{d_i}{W} \right) \quad \text{Eq. 2-18}$$

Robertson e Ulbrecht (1987) também propuseram uma correlação para a velocidade de cisalhamento máxima em um sistema com impelidor tipo turbina com pás planas para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

$$\dot{\gamma}_{\max} = 3,3 \cdot N^{1,5} \cdot d_i \left(\frac{\rho_L}{\mu_L} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 2-19}$$

onde:

- μ_L viscosidade do líquido (Pa.s);
- ρ_L densidade do líquido (kg.m^{-3});
- d_i diâmetro do impelidor (m);

Quando o fluido for não-Newtoniano, μ_L é a viscosidade aparente.

Kelly e Gigas (2003) propuseram uma correlação para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), através de modelagem por fluido dinâmica computacional, em função da frequência de rotação do impelidor (N), como segue:

$$\dot{\gamma}_m = 64,3 \cdot N \quad \text{Eq. 2-20}$$

No ajuste da equação 2-20, obteve-se um coeficiente de regressão (R^2) de 0,960. Para os mesmos dados, Pérez *et al.* (2006) ajustaram a seguinte correlação:

$$\dot{\gamma}_m = 33,1 \cdot N^{1,4} \quad \text{Eq. 2-21}$$

Com o valor do coeficiente de regressão (R^2) de 0,9990, consideravelmente melhor do que o da equação 2-20 proposta por Kelly e Gigas (2003).

Na Tabela 2.2 encontram-se as principais correlações para velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e máxima ($\dot{\gamma}_{\max}$), para biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado.

Tabela 2.2. Correlações para a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) em biorreator mecanicamente agitado (Chisti, 2001).

Referência	Correlação	Informações
Metzner e Otto (1957)	$\dot{\gamma}_m = k \cdot N$	Regime laminar não-Newtonianos
Calderbank e Moo-Young (1959)	$\dot{\gamma}_m = k \cdot \left(\frac{4 \cdot n}{3 \cdot n + 1} \right)^{\frac{n}{n-1}} \cdot N$	Regime laminar não-Newtonianos
Bowen (1986)	$\dot{\gamma}_m = 4,2 \cdot N \cdot \left(\frac{d_i}{d_T} \right)^{0,3} \cdot \left(\frac{d_i}{W} \right)$	Regime laminar Fluidos Newtonianos
Kelly e Gigas (2003)	$\dot{\gamma}_m = 64,3 \cdot N$	Regime de transição Fluidos Newtonianos e não-Newtonianos
Pérez <i>et al.</i> (2006)	$\dot{\gamma}_m = 33,1 \cdot N^{1,4}$	Regime de transição Fluidos Newtonianos e não-Newtonianos
Wichterle <i>et al.</i> (1984)	$\dot{\gamma}_{\max} = N \cdot (1 + 5,3 \cdot n)^{1/n} \left(\frac{N^{2-n} \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{K} \right)^{1/(1+n)}$	Regime turbulento Fluidos Newtonianos e não-Newtonianos
Bowen (1986)	$\dot{\gamma}_{\max} = 9,7 \cdot N \cdot \left(\frac{d_i}{d_T} \right)^{0,3} \cdot \left(\frac{d_i}{W} \right)$	Regime laminar Fluidos Newtonianos
Robertson e Ulbrecht (1987)	$\dot{\gamma}_{\max} = 3,3 \cdot N^{1,5} \cdot d_i \left(\frac{\rho_L}{\mu_L} \right)^{1/2}$	$1 \times 10^2 < Re < 2,9 \times 10^4$ Fluidos Newtonianos e não-Newtonianos

Algumas das correlações disponíveis na literatura para estimar as várias velocidades de cisalhamento são comparadas na Figura 2-6 para água em um biorreator convencional mecanicamente agitado com 0,1 m de diâmetro e impelidor tipo turbina de seis pás planas (Chisti, 2001).

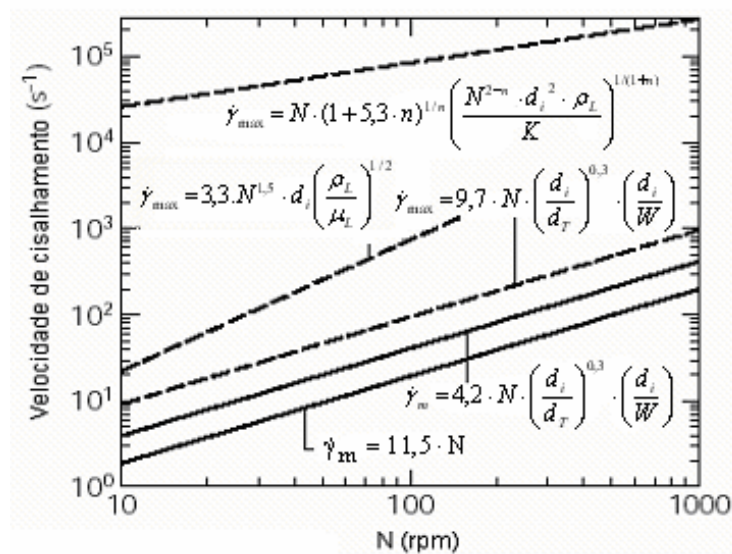


Figura 2.6. Comparação das várias correlações para velocidade de cisalhamento máxima e média ($\dot{\gamma}_{\max}$ e $\dot{\gamma}_m$) em biorreator convencional mecanicamente agitado (Chisti, 2001).

2.5 *Streptomyces clavuligerus*

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria do grupo dos actinomicetos. São microrganismos gram-positivos, morfologicamente semelhantes aos fungos e estritamente aeróbios, necessitando de oxigênio para o seu desenvolvimento. De acordo com Puentes *et al.* (1989) esta bactéria não metaboliza facilmente mono e dissacarídeos como glicose, frutose, sacarose e lactose, normalmente utilizados como principais fontes de carbono e energia em processos fermentativos. Por esta razão, normalmente se utiliza no cultivo desse microrganismo glicerol como fonte de carbono.

Ballows *et al.* (1992) relataram que *Streptomyces* são capazes de degradar resíduos de plantas e animais incluindo polissacarídeos, proteínas e compostos aromáticos. Embora seja capaz de degradar compostos mais complexos, espécies de *Streptomyces* necessitam somente de uma fonte de carbono orgânico, fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns sais minerais para o seu desenvolvimento. Também não requer vitaminas ou fatores de crescimento. De acordo com os mesmos autores, a maioria das espécies do gênero *Streptomyces* cresce a uma temperatura

entre 28 e 45°C (mesofílicas) e são encontrados, principalmente, em ambientes neutros (neutrofilicos). O ciclo de vida de *Streptomyces* baseia-se na germinação de esporos, crescimentos dos micélios e posterior esporulação. Os esporos não são tão resistentes como os artrosporos produzidos por outras espécies de bactérias, mas contribuem para a sua sobrevivência em condições adversas.

Espécies de *Streptomyces* são produtoras de mais ou menos 60% das substâncias antibióticas conhecidas. É caracterizado por sua habilidade em produzir uma grande variedade de metabólitos secundários (Sanchez e Braña, 1996).

Streptomyces clavuligerus, por exemplo, sintetiza compostos β -lactâmicos como cefamicina C e a penicilina N (Paradkar *et al.*, 1998), além de produzir dois tipos de inibidores de β -lactamase, o BLIP uma proteína inibidora de β -lactamase e o ácido clavulânico (Buttherworth, 1984).

A Figura 2.7 ilustra imagem típica de *Streptomyces clavuligerus*.

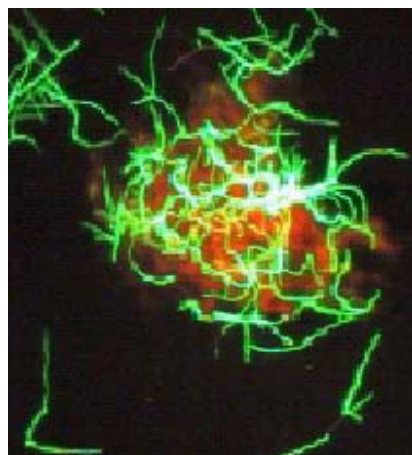


Figura 2.7. Imagem de *Streptomyces clavuligerus* (Pinto, 2002).

Por tratar-se de uma bactéria aeróbia e filamentosa, o cultivo de *Streptomyces clavuligerus* apresenta elevada demanda de oxigênio e, simultaneamente, gera caldos com alta

viscosidade aparente, o que acaba por dificultar a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, reduzindo a concentração de oxigênio dissolvido limitando o crescimento bacteriano. Para que não ocorra a limitação por oxigênio, aumenta-se a transferência enriquecendo o gás de alimentação com oxigênio ou alternativamente aumentando a frequência de rotação do impelidor.

Rosa (2002) analisou a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator tanque agitado e aerado sob diferentes condições de aeração e agitação do impelidor (N) e verificou que a produção de ácido clavulânico é afetada positivamente não apenas por altos valores de concentração de oxigênio dissolvido, mas também por altas frequências de rotação do impelidor, ou seja, para maiores condições de cisalhamento maior foi a produção do composto β -lactâmico.

O aumento da frequência de rotação do impelidor em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, que por ser filamentosos como observado na figura 2-7 é sensível ao cisalhamento, provoca mudanças reológicas e morfológicas no microrganismo influenciando a produção do produto de interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho propôs-se, inicialmente uma metodologia para quantificar a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado utilizando soluções de glicerol como fluidos Newtonianos e soluções de goma xantana como fluidos não-Newtonianos. Numa segunda etapa, foram realizados cultivos de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 no mesmo sistema em diferentes condições de operação e avaliadas as variações em diferentes variáveis do processo, decorrentes das condições de cisalhamento impostas aos cultivos.

3.1 Metodologia para avaliação da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$)

3.1.1 Fluidos

Foram utilizadas cinco diferentes soluções de glicerol como fluido Newtoniano e seis diferentes soluções de goma xantana como fluido não-Newtoniano. As viscosidades dinâmicas (μ) para as soluções de glicerol e as constantes reológicas (K e n) para as soluções de goma xantana foram obtidas a 28°C em reômetro de cilindros concêntricos da Brookfield modelo LV-DVIII+, a partir de reogramas.

Tabela 3.1. Viscosidade dinâmica dos fluidos Newtonianos.

Solução	μ (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)
SG 1	0,0117
SG 2	0,0109
SG 3	0,0088
SG 4	0,00573
SG 5	0,00138
Água	0,00084

Tabela 3.2. Propriedades reológicas dos fluidos não-Newtonianos.

Solução	Concentração (g.L ⁻¹)	K (Pa.s ⁿ)	n (-)
GX - 0,10%	1,0	0,094	0,54
GX - 0,15%	1,5	0,215	0,45
GX - 0,20%	2,0	0,343	0,41
GX - 0,25%	2,5	1,008	0,28
GX - 0,30%	3,0	1,343	0,26
GX - 0,35%	3,5	1,978	0,21

3.1.2 Equipamentos utilizados

Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada da New Brunswick modelo Bioflo III, munido de sistema de controle de temperatura, pH, medidor de oxigênio dissolvido e rotação, bem como rotâmetro para aeração e bombas para adição de antiespumante e soluções de ácido e de base.

Esse biorreator tem volume útil de 4L, diâmetro interno do tanque (d_T) de 0,17 m é equipado com dois impelidores tipo turbina de seis pás planas cada medindo 0,076 m de diâmetro (d_i) e quatro chicanas, largura da pá do impelidor (W) de 0,015 m e espaçamento de um diâmetro de impelidor entre os impelidores. O aspersor de ar utilizado é tipo anel de aço inox e está localizado na base do biorreator.

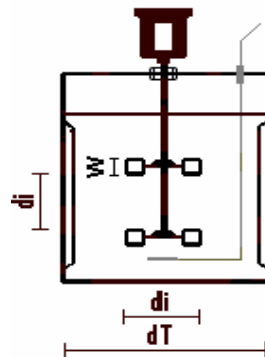


Figura 3.1. Dimensões do biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado empregado nas duas etapas do trabalho.

Para a medição da concentração de oxigênio dissolvido no meio utilizou-se um sistema com eletrodo de oxigênio da Mettler-Toledo modelo InPro 6800 acoplado ao analisador de oxigênio e para o controle da vazão de alimentação de ar um fluxômetro de massa modelo GFC371 da AALBORG. O controle da pressão no biorreator foi realizado manipulando uma válvula de pressão agulha instalada na tampa do biorreator e a medição utilizando-se um medidor eletrônico de pressão modelo SC 990 da T&S equipamentos eletrônicos. Um esquema dos equipamentos utilizados está representado na Figura 3.2.

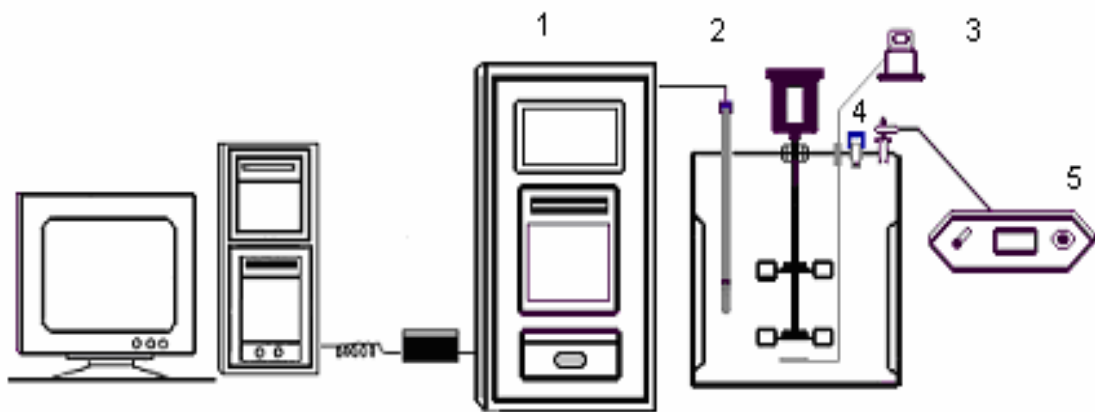


Figura 3.2. Apresentação esquemática dos equipamentos utilizados na presente etapa do trabalho (1-analisador de oxigênio, 2-eletrodo de oxigênio, 3-fluxômetro de massa, 4-válvula de pressão e 5-medidor de pressão).

3.1.3 Medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) foi determinado pelo método dinâmico da pressão (MDP) (Blazej *et al.*, 2004). A pressão no biorreator foi mudada bruscamente para aproximadamente ± 15 kPa. Desta maneira, uma mudança simultânea na concentração de oxigênio dissolvido no meio e na dispersão das bolhas foi observada apesar de manter a mesma vazão de alimentação de ar.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi obtido através da equação 3-1, ajustando os valores experimentais da concentração de oxigênio dissolvidos dado pelo eletrodo

de oxigênio (C_e) durante o tempo (t) e considerando o tempo de atraso na resposta do eletrodo (k_e).

$$C_e = C_{e0} \cdot e^{-k_e(t-t_0)} + C_{es} \cdot (1 - e^{-k_e(t-t_0)}) + \frac{k_e \cdot (C_{es} - C_{e0})}{k_e - k_L a} \cdot (e^{-k_e(t-t_0)} - e^{-k_L a(t-t_0)}) \quad \text{Eq. 3-1}$$

O C_{e0} é o sinal do eletrodo na condição inicial $t=t_0$. A constante de atraso do eletrodo de oxigênio (k_e) é o inverso do tempo de resposta (τ_e), o qual é determinado com sendo igual ao tempo que o sinal do eletrodo (C_e) leva para atinge 63,2 % de seu valor máximo.

3.1.4 Metodologia experimental

Inicialmente, para a água e para cada solução de glicerol (fluidos Newtonianos) foram obtidos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) para cinco diferentes condições de agitação (600, 700, 800, 900 e 1000 rpm) e duas diferentes condições de aeração (0,50 e 1,00 vvm).

Em seguida, nas mesmas condições de operação determinaram-se os valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) para soluções de goma xantana (fluidos não-Newtonianos).

Observa-se na Figura 2.5 que a relação linear existente entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento para fluidos Newtonianos não é válida para os fluidos não-Newtonianos e a curva de escoamento é expressa pelo modelo da lei da potência, equação 2-10.

Rearranjando a equação 2-11 obtém-se a velocidade de cisalhamento média que é definida como segue:

$$\dot{\gamma}_m = \left(\frac{\mu_{ap}}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \quad \text{Eq. 3-2}$$

Os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) obtidos para as soluções Newtonianas (glicerol e água) foram correlacionados com a frequência de rotação do impelidor (N) e a viscosidade (μ) de acordo com a equação 3-3.

$$k_L a = a \cdot N^b \cdot \mu^c \quad \text{Eq. 3-3}$$

Substituindo a viscosidade da equação 3-3 na viscosidade aparente da equação 3-2 obtém-se a equação 3-4 que expressa a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) e das constantes reológicas para fluidos não-Newtonianos.

$$\dot{\gamma}_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{k_L a}{a \cdot N^b} \right)^{\frac{1}{c(n-1)}} \quad \text{Eq. 3-4}$$

Conhecendo-se as constantes a , b e c , estimadas para os fluidos Newtonianos (água e glicerol) pela equação 3-3, e as propriedades reológicas dos fluidos não-Newtonianos é possível a partir da equação 3-4 estimar a velocidade de cisalhamento média no biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado para uma dada frequência de rotação do impelidor.

Na seqüência ajusta-se uma curva de $k_L a$ (s^{-1}) para cada vazão específica de alimentação de ar (0,50 e 1,00 vvm), para os fluidos não-Newtonianos, em função de N (rps) e de K ($\text{Pa} \cdot s^n$) e determinam-se as constantes d , e e f pela equação 3-5:

$$k_L a = d \cdot N^e \cdot K^f \quad \text{Eq. 3-5}$$

Substituindo a equação 3-5 na equação 3-4 obtém-se a equação 3-6 que expressa a velocidade de cisalhamento média em função apenas das constantes reológicas (K e n) e da frequência de rotação do impelidor (N).

$$\mu_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{d \cdot N^e \cdot K^f}{a \cdot N^b} \right)^{\frac{1}{c(n-1)}} \quad \text{Eq. 3-6}$$

3.2 Influência das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*

Para avaliar a influência das condições de cisalhamento nas variáveis de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* foram realizados quatro cultivos em diferentes condições de operação. Na Tabela 3.3 estão especificadas as condições de agitação e aeração aplicadas em cada cultivo.

Tabela 3.3. Condições de operação dos cultivos C1, C2, C3 e C4.

Cultivo	Rotação (rpm)	Vazão (vvm)
C1	700	0,50
C2	800	0,50
C3	900	0,50
C4	1000	0,50

3.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas a uma temperatura de -70°C e suspenso em uma solução crioprotetora contendo 10% v/v de glicerol.

3.2.2 Meios de Cultura

Os meios de culturas utilizados no presente trabalho estão descritos nas Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6.

Tabela 3.4. Composição do meio de cultura de reativação (MR).

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	15,0
Extrato de malte (g.L ⁻¹)	10,0
Peptona bacteriológica (g.L ⁻¹)	10,0
Extrato de levedo (g.L ⁻¹)	1,00
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	2,50
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,75
MOPS (g.L ⁻¹) ⁽¹⁾	21,0
Soluções de sais (mL.L ⁻¹) ⁽²⁾	1,00
pH	6,8

⁽¹⁾ ácido 3-[N-Morpholino]-propanesulfônico: utilizado para manter o pH do meio em torno de 6,8.

⁽²⁾ 1g.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 1g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 1g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O

Tabela 3.5. Composição do meio de cultura de inóculo (MI).

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	20,0
Soytone (g.L ⁻¹) ⁽¹⁾	17,0
Extrato de levedo (g.L ⁻¹)	1,00
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	0,80
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,75
Soluções de sais (mL.L ⁻¹) ⁽²⁾	1,00
MOPS (g.L ⁻¹) ⁽³⁾	21,0
pH	6,8

⁽¹⁾ Soytone: hidrolisado enzimático de proteína de soja

⁽²⁾ 1g.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 1g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 1g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O

⁽³⁾ ácido 3-[N-Morpholino]-propanesulfônico: utilizado para manter o pH do meio em torno de 6,8.

Tabela 3.6. Composição do meio de cultura de produção (MP).

Componente	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	20,0
Soytone (g.L ⁻¹) ⁽¹⁾	17,0
Extrato de levedo (g.L ⁻¹)	1,00
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	0,80
MgSO ₄ (g.L ⁻¹)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (mL.L ⁻¹)	1,00
PH	6,8

⁽¹⁾ Soytone: hidrolisado enzimático de proteína de soja.

⁽²⁾ Solução de sais contendo: 1g.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 1g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 1g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O

Observe que o meio de cultura de produção difere do meio de inóculo apenas pela ausência de MOPS, uma vez que o pH foi controlado no biorreator por adição de ácido e base.

3.2.3 Equipamentos utilizados

3.2.3.1 Autoclaves

Alguns materiais envolvidos na realização dos processos de fermentação, tais como meios de cultura, soluções de ácido, base e antiespumante, vidraria, reator, etc, foram esterilizados em autoclaves marca FABBE, a 121°C.

3.2.3.2 Câmara Asséptica

Para garantir uma manipulação asséptica do microrganismo foi utilizada uma câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, contendo um bico de Bunsen e lâmpada germicida UV, em todas as etapas que se fizeram necessárias.

3.2.3.3 Ultrafreezer

As amostras para análise de glicerol bem como os criotubos contendo os microrganismos foram armazenados em um ultrafreezer FORMA SCIENTIFIC a temperatura de -70°C .

3.2.3.4 Mesa incubadora rotativa

As etapas de reativação e crescimento do microrganismo foram realizadas em mesa incubadora rotativa da New Brunswick Scientific, Inc., modelo G-25 com controles de temperatura e agitação.

3.2.3.5 Reômetro

Para as medidas reológicas foi utilizado o reômetro LV-DVIII+ de cilindros concêntricos da BROOKFIELD.

3.2.3.6 Analisador de dióxido de carbono

Para as medidas das concentrações de dióxido de carbono no gás de saída do biorreator foi utilizado um analisador da ROSEMOUNT ANALYTICAL, modelo 880A, acoplado à saída do biorreator.

3.2.3.7 Controlador de pH

O controlador de pH da New Brunswick Scientific, INC, modelo pH-40 foi utilizado.

3.2.3.8 Biorreator de bancada

Os experimentos em batelada foram realizados em biorreator de bancada da New Brunswick modelo Bioflo III com quatro litros de volume útil. Esse biorreator é munido de

controle de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e rotação, bem como rotâmetro para aeração e bombas para as alimentações de soluções de antiespumante, ácido e base.

3.2.3.9 Cromatógrafo

Para a realização das análises de glicerol foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da WATERS. O sistema contém duas bombas modelo 510, refratômetro W410, injetor Rheodyne 7125 com loop de 20 µl.

3.2.4 Metodologia experimental

Os cultivos foram realizados em três etapas, a saber, reativação do microrganismo, crescimento e produção. Primeiramente, 3,5 mL de suspensão de células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* mantidos em criotubos foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação, em seguida foram incubados por 24 horas a 28°C e 250 rpm. Posteriormente, 5 mL de suspensão foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de inóculo, esta etapa foi realizada em mesa incubadora rotativa a 28°C e 250 rpm por 24 horas.

Na etapa de produção, após a etapa de crescimento, transferiu-se para o biorreator o volume de caldo resultante da etapa de crescimento de tal modo que correspondesse a 10% do volume total de caldo. O controle de pH foi feito por adição de soluções de HCl (2M) e NaOH (1M) já que o meio de cultura de produção utilizado no biorreator foi isento de MOPS.

Os procedimentos experimentais das três etapas podem ser visualizados na Figura 3.3:

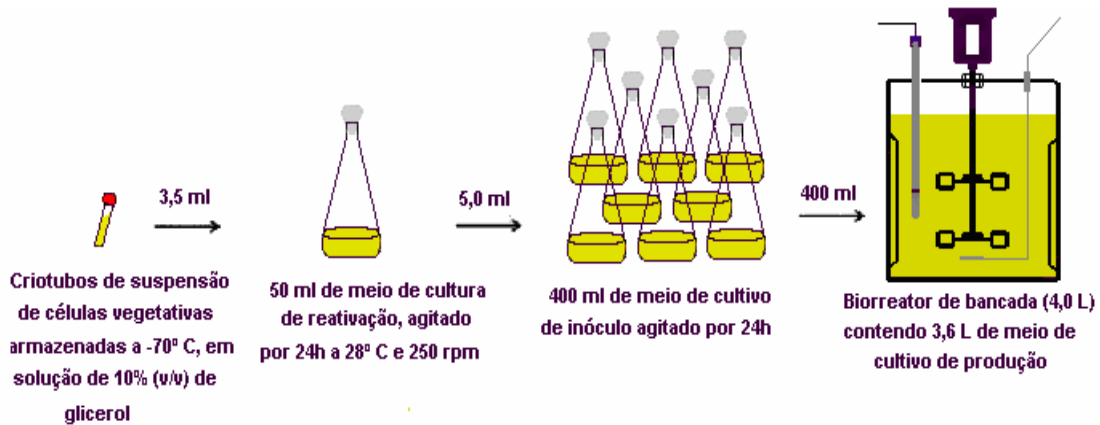


Figura 3.3. Representação esquemática do procedimento experimental.

Os cultivos foram realizados em batelada no biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado. Amostras de 25 mL foram retiradas de três em três horas para as análises. Em todas as amostras foram determinados os valores dos parâmetros reológicos dos caldos de cultivo (índice de consistência, K, e índice de comportamento de escoamento, n), a concentração de glicerol e a determinação da concentração celular pelo método massa seca.

Ao longo dos cultivos também foram realizadas medidas da concentração de dióxido de carbono no gás de saída do biorreator e concentração de oxigênio dissolvido do caldo fermentativo. Foram realizados quatro cultivos que tiveram duração de 30 horas, até o termino da concentração de glicerol.

3.2.5 Metodologias analíticas

3.2.5.1 Análise de glicerol

As concentrações de glicerol foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado 80°C, 1 mL.min⁻¹ e tempo de retenção

entre 10 e 12 minutos. As concentrações de glicerol foram determinadas a partir de uma curva de calibração obtida com soluções com concentrações inferiores a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato.

3.2.5.2 Caracterização reológica do caldo de cultivo

Para o cálculo dos parâmetros reológicos K (índice de consistência) e n (índice de comportamento de escoamento) considerou-se o caldo de cultivo como sendo pseudoplástico. Tais fluídos seguem a lei da potência, descrita pela equação 2-10.

Os valores de tensão de cisalhamento (τ) e velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) foram obtidos pelo reômetro, e por regressão não linear os valores de K e n . Com os valores do índice de consistência (K), que é diretamente proporcional à concentração celular (C_x), como observado na equação 2-13, é possível se ter uma estimativa do crescimento microbiano.

3.2.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi obtida por massa seca após filtração de um volume conhecido de amostra (filtro previamente pesado de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro), o filtro é lavado com água destilada, em seguida o filtro é levado ao microondas e secado por cinco minutos, logo após é resfriado e pesado.

3.2.5.4 Determinação da vazão molar de dióxido de carbono

Para a determinação da vazão molar de dióxido de carbono no efluente do biorreator, utilizou-se um analisador de dióxido de carbono acoplado à saída do biorreator, que forneceu a porcentagem molar do gás.

Supondo que o ar de alimentação do reator esteja seco (21,0 % de O_2 , 79,0 % de N_2) e que o gás efluente seja uma mistura de O_2 , CO_2 e N_2 , o quociente respiratório (RQ), definido pela

relação entre a quantidade de CO₂ gerada pela quantidade de O₂ consumida no processo, considerando desprezível o teor de dióxido de carbono no ar de entrada, é quantificado de acordo com a equação 3-7:

$$RQ = \frac{\dot{n}_{CO_2 S}}{\dot{n}_{O_2 e} - \dot{n}_{O_2 S}} \quad \text{Eq. 3-7}$$

onde:

$\dot{n}_{CO_2 S}$ vazão molar de CO₂ na saída do biorreator (mol.h⁻¹)

$\dot{n}_{O_2 e}$ vazão molar de O₂ na entrada do biorreator (mol.h⁻¹)

$\dot{n}_{O_2 S}$ vazão molar de O₂ na saída do biorreator (mol.h⁻¹)

Admitindo que a vazão molar do ar na entrada ($\dot{n}_{ar e}$) e a vazão molar do gás na saída ($\dot{n}_{g S}$) sejam iguais, o que significa imaginar que cada mol de oxigênio consumido gere um mol de dióxido de carbono. Deste modo, o quociente respiratório (RQ) é igual a 1.

$$RQ = \frac{\dot{n}_{CO_2 S}}{\dot{n}_{O_2 e} - \dot{n}_{O_2 S}} = 1 \quad \text{Eq. 3-8}$$

Logo:

$$\dot{n}_{CO_2 S} = \dot{n}_{O_2 e} - \dot{n}_{O_2 S} \quad \text{Eq. 3-9}$$

Como o nitrogênio é um gás inerte, a vazão molar de entrada é igual a vazão de saída e a fração molar do nitrogênio ($x_{N_2 S}$) na saída do biorreator é igual a:

$$x_{N_2 S} = 1 - x_{O_2 S} - x_{CO_2 S} \quad \text{Eq. 3-10}$$

Portanto, a vazão molar de dióxido de carbono na saída do biorreator é dada por:

$$\dot{n}_{CO_2} = \dot{n}_{ar} \cdot x_{CO_2} \quad \text{Eq. 3-11}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da velocidade de cisalhamento em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado

Na Tabela 4-1 estão apresentados os valores do o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) obtidos para diferentes frequências de rotação do impelidor (N) e vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) para os fluidos Newtonianos (água e solução glicerol) com diferentes viscosidades (μ).

Tabela 4-1: Valores de k_{La} em em biorreator convencional operado com fluido Newtoniano em diferentes condições de agitação e aeração.

Fluido	μ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Φ_{ar} (vvm)	N (rpm)	k_{La} (s^{-1}) 0,50 vvm	k_{La} (s^{-1}) 1,00 vvm
Sol. Glicerol 1	0,01170	0,50 e 1,00	600	0,01651	0,01847
Sol. Glicerol 1	0,01170	0,50 e 1,00	700	0,01817	0,02091
Sol. Glicerol 1	0,01170	0,50 e 1,00	800	0,02224	0,02365
Sol. Glicerol 1	0,01170	0,50 e 1,00	900	0,02516	0,02652
Sol. Glicerol 1	0,01170	0,50 e 1,00	1000	0,02650	0,02756
Sol. Glicerol 2	0,01090	0,50 e 1,00	600	0,01788	0,01943
Sol. Glicerol 2	0,01090	0,50 e 1,00	700	0,01959	0,02231
Sol. Glicerol 2	0,01090	0,50 e 1,00	800	0,02308	0,02555
Sol. Glicerol 2	0,01090	0,50 e 1,00	900	0,02624	0,02836
Sol. Glicerol 2	0,01090	0,50 e 1,00	1000	0,02792	0,02922
Sol. Glicerol 3	0,00880	0,50 e 1,00	600	0,01855	0,02023
Sol. Glicerol 3	0,00880	0,50 e 1,00	700	0,02089	0,02354
Sol. Glicerol 3	0,00880	0,50 e 1,00	800	0,02417	0,02693
Sol. Glicerol 3	0,00880	0,50 e 1,00	900	0,02702	0,02887
Sol. Glicerol 3	0,00880	0,50 e 1,00	1000	0,02880	0,03001
Sol. Glicerol 4	0,00573	0,50 e 1,00	600	0,02208	0,02451
Sol. Glicerol 4	0,00573	0,50 e 1,00	700	0,02429	0,0263
Sol. Glicerol 4	0,00573	0,50 e 1,00	800	0,02735	0,02915
Sol. Glicerol 4	0,00573	0,50 e 1,00	900	0,02951	0,03135
Sol. Glicerol 4	0,00573	0,50 e 1,00	1000	0,03133	0,03259
Sol. Glicerol 5	0,00138	0,50 e 1,00	600	0,03632	0,04087
Sol Glicerol 5	0,00138	0,50 e 1,00	700	0,04046	0,04726
Sol. Glicerol 5	0,00138	0,50 e 1,00	800	0,04767	0,05421
Sol. Glicerol 5	0,00138	0,50 e 1,00	900	0,05123	0,05899
Sol. Glicerol 5	0,00138	0,50 e 1,00	1000	0,05593	0,06151
Água	0,00084	0,50 e 1,00	600	0,04250	0,05309
Água	0,00084	0,50 e 1,00	700	0,05050	0,05904
Água	0,00084	0,50 e 1,00	800	0,05430	0,06592
Água	0,00084	0,50 e 1,00	900	0,06000	0,07554
Água	0,00084	0,50 e 1,00	1000	0,06370	0,08266

Para cada vazão de alimentação de ar (0,50 e 1,00 vvm) respectivamente, valores do coeficiente volumétrico transferência de oxigênio foram graficados em função da frequência de rotação do impelidor (N) para cada fluido Newtoniano. Observa-se pelas Figuras 4.1 e 4.2 que houve uma maior transferência de oxigênio com o aumento da frequência de rotação do impelidor (N), aumento da vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) e diminuição da viscosidade (μ), resultados esperados.

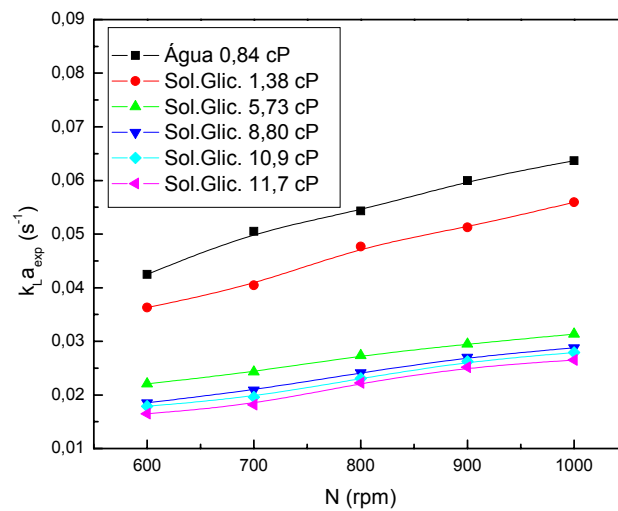


Figura 4.1. Dados experimentais de k_{La} a 0,50 vvm em função da frequência de rotação do impelidor (N) para fluidos Newtonianos.

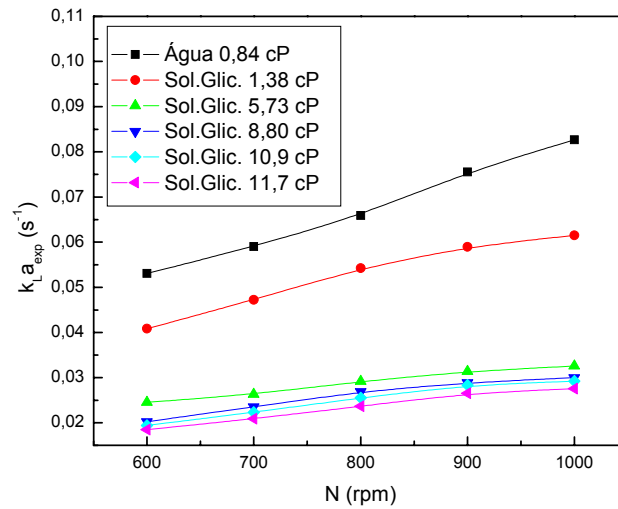


Figura 4.2. Dados experimentais de $k_L a$ a 1,00 vvm em função da frequência de rotação do impelidor (N) para fluidos Newtonianos.

Para cada condição de aeração foi ajustada aos valores experimentais a correlação dada pela equação 3-3. Desta forma foram determinadas as constantes a, b e c para cada vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}).

$$k_L a = a \cdot N^b \cdot \mu^c \quad \text{Eq. 3-3}$$

Para a vazão de alimentação de 0,50 vvm obtiveram-se os seguintes valores para as constantes a, b e c com os respectivos erros, juntamente com o coeficiente de correlação:

$$a = 0,00056 \pm 0,00005$$

$$b = 0,81795 \pm 0,03620$$

$$c = -0,34774 \pm 0,00527$$

$$R^2 = 0,996$$

Observa-se que a correlação apresentada ajustou-se muito bem aos dados experimentais, pelo alto coeficiente do ajuste.

Substituindo os valores das constantes na equação 3-3 obtém-se a equação 4-1:

$$k_L a = 0,00056 \cdot N^{0,81795} \cdot \mu^{-0,34774} \quad \text{Eq. 4-1}$$

Na Figura 4-3 encontra-se uma comparação entre os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) obtidos experimentalmente e os fornecidos pela equação 4-1 para a condição de 0,50 vvm. Nota-se que a grande maioria dos valores de $k_L a$ encontram-se dentro de $\pm 5\%$.

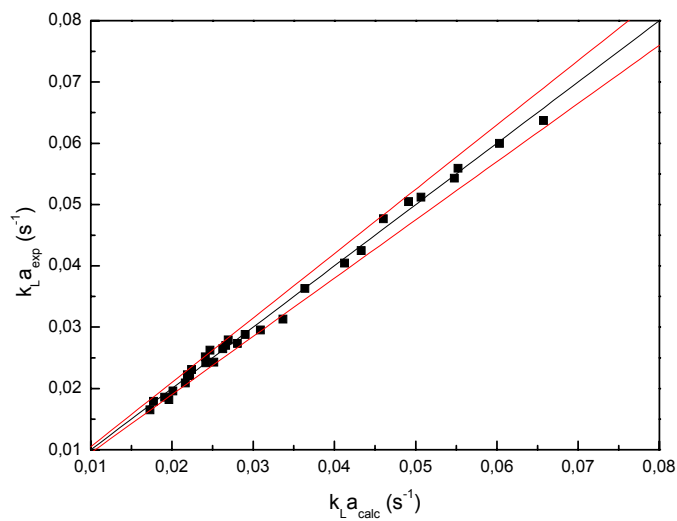


Figura 4.3. Valores experimentais de $k_L a$ em função dos valores calculado pela equação 4-1 para fluidos Newtonianos aerados a 0,50 vvm.

Em relação à vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 1,00 vvm os resultados obtidos para as constantes com os respectivos erros e para o coeficiente de ajuste (R^2) foram os seguintes:

$$a = 0,00045 \pm 0,00006$$

$$b = 0,82313 \pm 0,04363$$

$$c = -0,40389 \pm 0,00789$$

$$R^2 = 0,993$$

Observa-se que o coeficiente de correlação desse segundo ajuste também foi próximo de 1, mostrando que a correlação ajustou-se muito bem aos dados experimentais.

Substituindo os valores das constantes na equação 3-3, obtém-se a equação 4-2:

$$k_L a = 0,00045 \cdot N^{0,82313} \cdot \mu^{-0,40389} \quad \text{Eq. 4-2}$$

Na Figura 4.4 encontra-se uma comparação entre os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) obtidos experimentalmente e os fornecidos pela equação 4-2 para a condição de aeração de 1,00 vvm. Observa-se novamente que os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio também estão dentro do desvio de $\pm 5\%$.

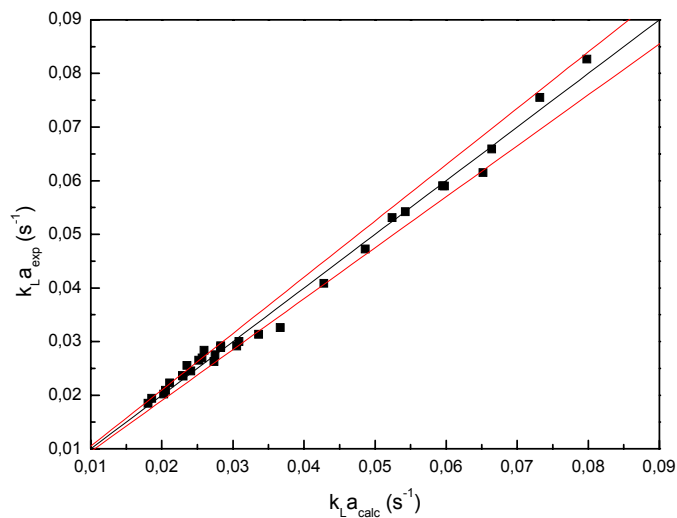


Figura 4.4. Dados experimentais de $k_L a$ em função do $k_L a$ calculado pela equação 4-2 para fluidos Newtonianos aerados a 1,00 vvm.

Na seqüência foram determinados valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) para diferentes freqüências de rotação do impelidor (N) e vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) e de parâmetros reológicos (K e n) para diferentes soluções de solução de goma xantana (fluidos não-Newtonianos). Esses resultados são apresentados na Tabela 4-2.

Tabela 4.2. Valores de $k_{L,a}$ em função da vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) e da frequência de rotação do impelidor (N) para diferentes fluidos não-Newtonianos (soluções de goma xantana).

Fluido (m/v)	K (Pa.s ⁿ)	n (-)	Φ_{ar} (vvm)	N (rpm)	$k_{L,a}$ (s ⁻¹) 0,50 vvm	$k_{L,a}$ (s ⁻¹) 1,00 vvm
GX 0,10%	0,094	0,54	0,50 e 1,00	600	0,0241	0,0265
GX 0,10%	0,094	0,54	0,50 e 1,00	700	0,0288	0,0328
GX 0,10%	0,094	0,54	0,50 e 1,00	800	0,0342	0,0416
GX 0,10%	0,094	0,54	0,50 e 1,00	900	0,0389	0,0471
GX 0,10%	0,094	0,54	0,50 e 1,00	1000	0,0446	0,0521
GX 0,15%	0,215	0,45	0,50 e 1,00	600	0,0214	0,0219
GX 0,15%	0,215	0,45	0,50 e 1,00	700	0,0251	0,0294
GX 0,15%	0,215	0,45	0,50 e 1,00	800	0,0309	0,0345
GX 0,15%	0,215	0,45	0,50 e 1,00	900	0,0356	0,0399
GX 0,15%	0,215	0,45	0,50 e 1,00	1000	0,0412	0,0467
GX 0,20%	0,343	0,41	0,50 e 1,00	600	0,0194	0,0194
GX 0,20%	0,343	0,41	0,50 e 1,00	700	0,0228	0,0260
GX 0,20%	0,343	0,41	0,50 e 1,00	800	0,0280	0,0309
GX 0,20%	0,343	0,41	0,50 e 1,00	900	0,0323	0,0365
GX 0,20%	0,343	0,41	0,50 e 1,00	1000	0,0374	0,0417
GX 0,25%	1,008	0,28	0,50 e 1,00	600	0,0171	0,0185
GX 0,25%	1,008	0,28	0,50 e 1,00	700	0,0205	0,0230
GX 0,25%	1,008	0,28	0,50 e 1,00	800	0,0253	0,0284
GX 0,25%	1,008	0,28	0,50 e 1,00	900	0,0298	0,0324
GX 0,25%	1,008	0,28	0,50 e 1,00	1000	0,0335	0,0386
GX 0,30%	1,343	0,26	0,50 e 1,00	600	0,0161	0,0170
GX 0,30%	1,343	0,26	0,50 e 1,00	700	0,0192	0,0219
GX 0,30%	1,343	0,26	0,50 e 1,00	800	0,0233	0,0261
GX 0,30%	1,343	0,26	0,50 e 1,00	900	0,0272	0,0297
GX 0,30%	1,343	0,26	0,50 e 1,00	1000	0,0311	0,0348
GX 0,35%	1,978	0,21	0,50 e 1,00	600	0,0155	0,0170
GX 0,35%	1,978	0,21	0,50 e 1,00	700	0,0191	0,0197
GX 0,35%	1,978	0,21	0,50 e 1,00	800	0,0220	0,0231
GX 0,35%	1,978	0,21	0,50 e 1,00	900	0,0262	0,0289
GX 0,35%	1,978	0,21	0,50 e 1,00	1000	0,0297	0,0327

As Figuras 4.5 e 4.6 ilustra os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) para as soluções de goma xantana aeradas a 0,50 e 1,00 vvm, respectivamente.

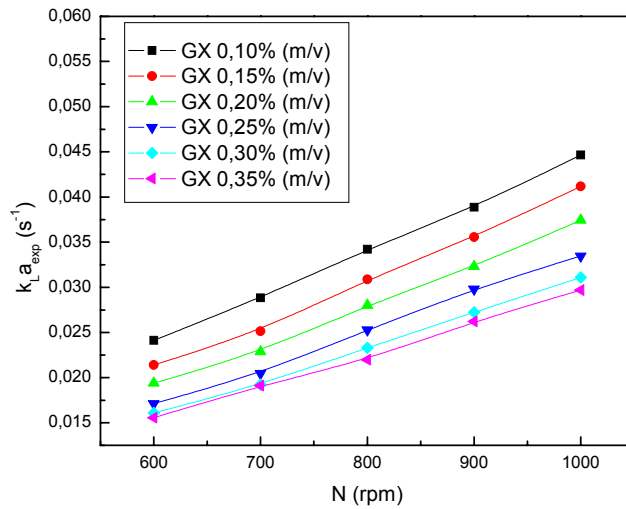


Figura 4.5. Dados experimentais de $k_L a$ em função de N para fluidos não-Newtonianos a 0,50 vvm.

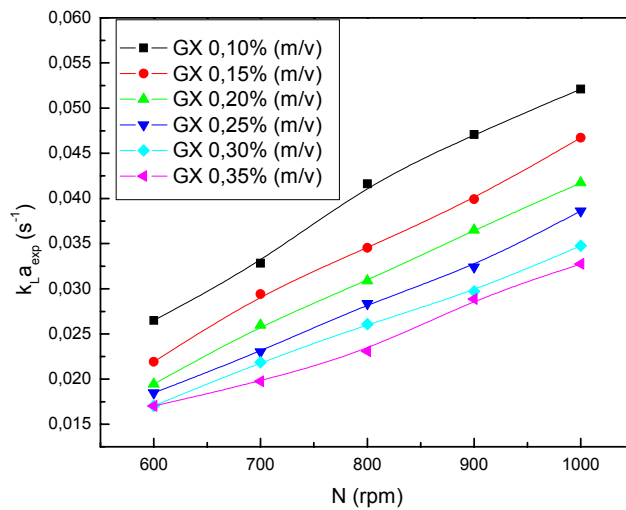


Figura 4.6. Dados experimentais de $k_L a$ em função de N para fluidos não-Newtonianos a 1,00 vvm

Analisando as Figuras 4.5 e 4.6 observa-se que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) aumenta com a frequência de rotação do impelidor (N), vazão de alimentação

de ar (Φ_{ar}) e diminui com o aumento da concentração de goma xantana, o que torna esses fluidos mais viscosos.

A seguir, procedeu-se o cálculo da velocidade de cisalhamento média experimental ($\dot{\gamma}_m$) para fluidos não-Newtonianos utilizando-se a equação 3-4.

$$\dot{\gamma}_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{k_L a}{a \cdot N^b} \right)^{\frac{1}{c(n-1)}} \quad \text{Eq. 3-4}$$

Os valores experimentais obtidos pela equação 3-4 para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento para as vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm estão ilustrados nas Figuras 4.7 e 4.8, respectivamente.

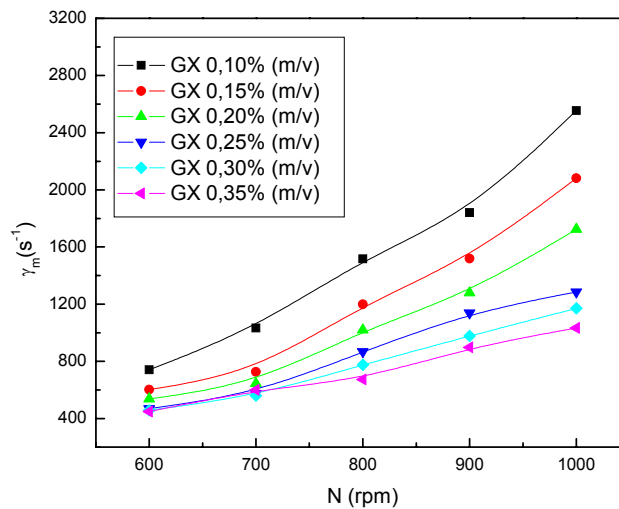


Figura 4.7. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) a 0,50 vvm para soluções de goma xantana em diferentes concentrações.

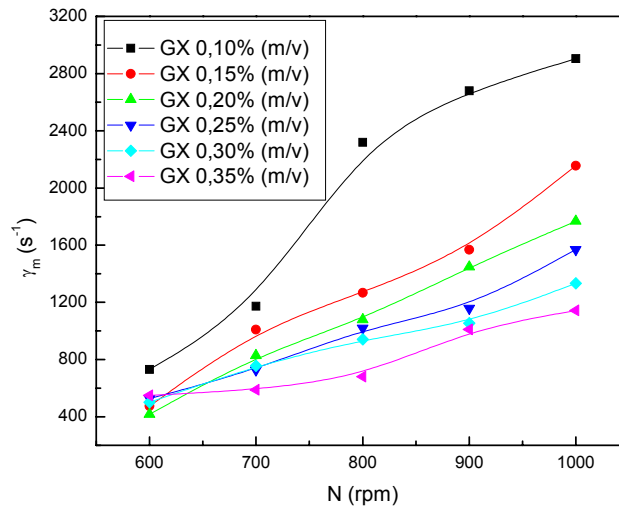


Figura 4.8. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) a 1,00 vvm para soluções de goma xantana em diferentes concentrações.

Através dos gráficos nota-se que a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) é maior quanto maior for a frequência de rotação do impelidor (N) e da vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) e menor for concentração do fluido não-Newtoniano, que se traduz principalmente em menores valores do índice de consistência (K).

Na seqüência ajustou-se, uma correlação dada pela equação 4-3 que relaciona o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$ em s^{-1}) em função da frequência de rotação do impelidor (N em rps) e do índice de consistência (K em $Pa \cdot s^n$) para fluidos não-Newtonianos, determinando-se as constantes d, e e f para cada vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}).

$$k_L a = d \cdot N^e \cdot K^f \quad \text{Eq. 4-3}$$

Para a vazão de alimentação de ar de 0,50 vvm, os valores das constantes d, e e f com os respectivos erros e o coeficiente de ajuste (R^2) foram os seguintes:

$$d = 0,00088 \pm 0,00005$$

$$e = 1,28460 \pm 0,02229$$

$$f = -0,13588 \pm 0,00338$$

$$R^2 = 0,996$$

Com isso tem-se a equação 4-3 com os valores das constantes ajustadas:

$$k_{La} = 0,00088 \cdot N^{1,2846} \cdot K^{-0,13588} \quad \text{Eq. 4-4}$$

Para a vazão de 1,00 vvm, as constantes ajustadas com os respectivos erros e o coeficiente de ajuste (R^2) da correlação tiveram os seguintes valores:

$$d = 0,00077 \pm 0,00008$$

$$e = 1,37184 \pm 0,03715$$

$$f = -0,15763 \pm 0,00560$$

$$R^2 = 0,992$$

Resultando na equação 4-5:

$$k_{La} = 0,00077 \cdot N^{1,37184} \cdot K^{-0,15763} \quad \text{Eq. 4-5}$$

Para ambas as vazões específicas de alimentação específica de ar (Φ_{ar}) o coeficiente de correlação foi muito próximo de 1, mostrando que as correlações ajustaram-se muito bem aos dados experimentais.

Substituindo a equação 4-4 na equação 3-4 e com os valores das constantes a, b e c para a vazão de 0,50 vvm e substituindo a equação 4-5 na equação 3-4 e com os valores das constantes a, b e c para a vazão de 1,00 vvm, obteve-se respectivamente as equações 4-6 e 4-7 para previsão de velocidades médias de cisalhamento (\mathcal{R}_m) aeradas a 0,50 e 1,00 vvm.

$$\mathcal{R}_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{0,00088 \cdot N^{1,2846} \cdot K^{-0,13588}}{0,00056 \cdot N^{0,81795}} \right)^{\frac{1}{-0,34774 \cdot (n-1)}} \quad \text{Eq. 4-6}$$

$$\gamma_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{0,00077 \cdot N^{1,37184} \cdot K^{-0,15763}}{0,00045 \cdot N^{0,82313}} \right)^{\frac{1}{-0,40389 \cdot (n-1)}} \quad \text{Eq. 4-7}$$

As equações 4-6 e 4-7 uma vez fatoradas, reduzem-se às equações 4-8 e 4-9, respectivamente, aeradas a 0,50 e 1,00 vvm:

$$\gamma_m = K^{\frac{0,6092}{1-n}} \cdot (1,571 \cdot N^{0,4665})^{\frac{2,876}{1-n}} \quad (\Phi_{\text{ar}} = 0,50 \text{ vvm}) \quad \text{Eq. 4-8}$$

$$\gamma_m = K^{\frac{0,6097}{1-n}} \cdot (1,711 \cdot N^{0,5487})^{\frac{2,476}{1-n}} \quad (\Phi_{\text{ar}} = 1,00 \text{ vvm}) \quad \text{Eq. 4-9}$$

As figuras 4.9 e 4.10 comparam os valores de γ_m obtidos experimentalmente pela equação 3-4, com os valores das constantes obtidos para cada vazão, e os valores de γ_m calculados obtidos pelas equações 4-8 e 4-9 para as vazões de 0,50 e 1,00 vvm, respectivamente.

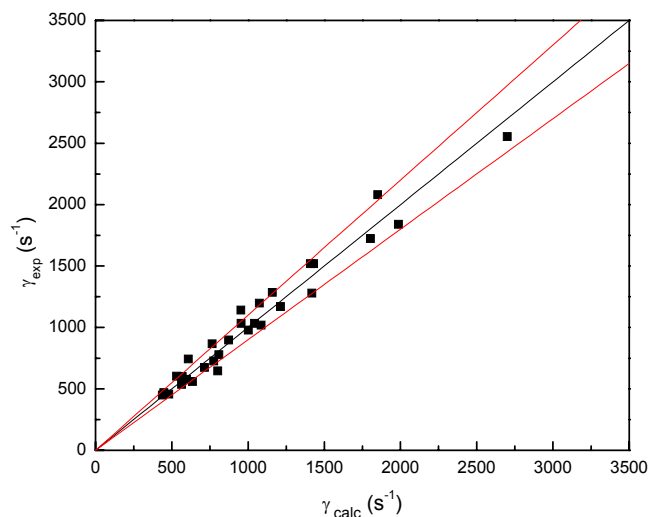


Figura 4.9. Valores experimentais da velocidade de cisalhamento média (γ_{exp}) em função dos valores da velocidade de cisalhamento média (γ_{calc}) calculada pela equação 4-8 para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 vvm.

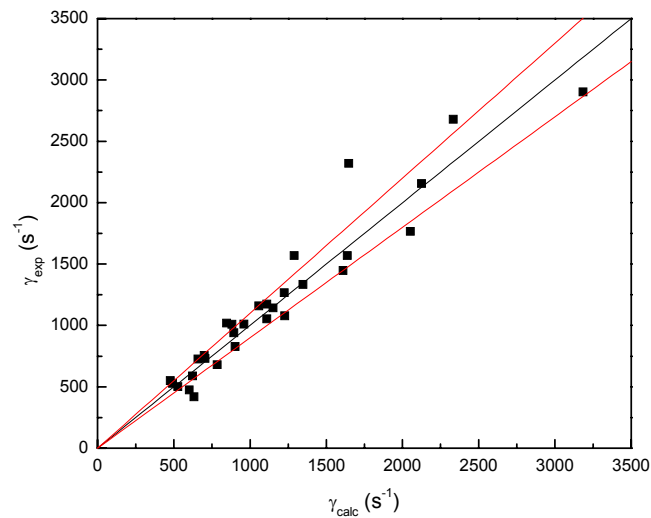


Figura 4.10. Valores experimentais da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{exp}$) em função dos valores de velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_{calc}$) calculada pela equação 4-9 para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 1,00 vvm.

As Figuras 4.9 e 4.10 mostram que as velocidades de cisalhamento obtidas experimentalmente e pelas equações 4-8 e 4-9 estão dentro do desvio de $\pm 10\%$.

Para verificar o efeito no biorreator convencional tanque agitado e aerado da vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) na velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), foram determinadas as velocidades de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) pelas equações 4-8 e 4-9 nas unidades do sistema internacional e graficadas em função da frequência de rotação do impelidor (N) para as vazões de 0,50 e 1,00 vvm, fixando o valor do índice de consistência (K) em $1,008 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ e o valor do índice de comportamento de escoamento em 0,28, que correspondem a uma solução de goma xantana na concentração de 0,25 % (m/v).

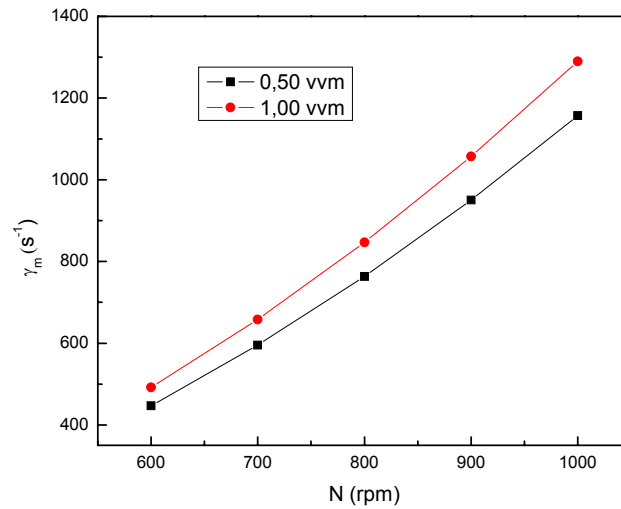


Figura 4.11. Velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}).

A Figura 4-11 mostra que, para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 1,00 vvm, a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) foi superior à de 0,50 vvm em média de 9,8 % nos cinco pontos.

Com o objetivo de avaliar a influência de cada variável operacional (N e Φ_{ar}) ajustou-se uma correlação para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) e da vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}), representada pela equação 4-10:

$$\dot{\gamma}_m = P_1 \cdot N^{P_2} \cdot \Phi_{ar}^{P_3} \quad \text{Eq. 4-10}$$

As constantes P_1 , P_2 e P_3 com os respectivos erros e o coeficiente de correlação estão expressos na seqüência:

$$P_1 = 12,253 \pm 0,177$$

$$P_2 = 1,876 \pm 0,004$$

$$P_3 = 0,152 \pm 0,002$$

$$R^2 = 0,99997$$

A equação 4-10 com os valores das constantes fica da seguinte forma:

$$\dot{\gamma}_m = 12,25 \cdot N^{1,876} \cdot \Phi_{ar}^{0,152} \quad \text{Eq. 4-11}$$

Na equação 4-11, observa-se que P_2 é 12 vezes maior que P_3 , desta forma, a frequência de rotação do impelidor (N) é a variável de operação que mais influencia na velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$).

Na seqüência, para determinar o regime de escoamento ($Re < 10$: laminar; $Re > 5 \times 10^3$: turbulento) em que são aplicáveis as correlações da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função da frequência de rotação do impelidor (N) e dos parâmetros reológicos (K e n), representadas pelas equações 4-8 e 4-9, calculou-se a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) para cada solução de goma xantana (fluidos não-Newtonianos), em seguida a viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) pela equação 2-11.

$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K \dot{\gamma}_m^{n-1} \quad \text{Eq. 2-11}$$

Com os valores da viscosidade aparente (μ_{ap}), obtidos pela equação 2-11 para cada solução de goma xantana, determinou-se o número de Reynolds (Re), nas unidades do sistema internacional, pela equação 4-12:

$$Re = \frac{N \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{\mu_{ap}} \quad \text{Eq. 4-12}$$

Na Tabela 4.3. estão os valores obtidos para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) e o número de Reynolds (Re) para as vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm.

Tabela 4.3. Valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) e o número de Reynolds (Re) para as vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm.

Fluido (m/v)	N (rpm)	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹)	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹)	μ_{ap} (Pa.s)	μ_{ap} (Pa.s)	Re (-)	Re (-)
		0,50vvm	1,00vvm	0,50 vvm	1,00 vvm	0,50vvm	1,00vvm
GX 0,10%	600	607,06	704,50	0,00493	0,00460	11716	12547
GX 0,10%	700	951,68	1110,71	0,00401	0,00373	16809	18048
GX 0,10%	800	1404,86	1647,70	0,00335	0,00311	22980	24729
GX 0,10%	900	1980,73	2333,21	0,00286	0,00265	30278	32647
GX 0,10%	1000	2693,29	3184,90	0,00248	0,00230	38751	41857
GX 0,15%	600	530,74	601,56	0,00681	0,00635	8486	9091
GX 0,15%	700	773,02	880,33	0,00554	0,00515	12174	13077
GX 0,15%	800	1070,67	1224,32	0,00463	0,00430	16644	17918
GX 0,15%	900	1427,04	1637,76	0,00395	0,00366	21929	23655
GX 0,15%	1000	1845,25	2124,60	0,00343	0,00317	28066	30328
GX 0,20%	600	562,91	632,87	0,00818	0,00763	7065	7570
GX 0,20%	700	799,23	902,56	0,00665	0,00619	10136	10890
GX 0,20%	800	1082,80	1227,47	0,00556	0,00516	13857	14921
GX 0,20%	900	1415,36	1609,90	0,00475	0,00440	18257	19699
GX 0,20%	1000	1798,54	2051,94	0,00412	0,00381	23366	25256
GX 0,25%	600	446,63	492,01	0,01246	0,01162	4636	4970
GX 0,25%	700	595,25	658,10	0,01013	0,00943	6651	7150
GX 0,25%	800	763,42	846,68	0,00847	0,00786	9093	9796
GX 0,25%	900	950,78	1057,40	0,00723	0,00670	11981	12933
GX 0,25%	1000	1157,03	1289,97	0,00628	0,00581	15333	16582
GX 0,30%	600	479,64	527,09	0,01394	0,01300	4144	4444
GX 0,30%	700	634,30	699,51	0,01133	0,01054	5946	6392
GX 0,30%	800	808,05	893,85	0,00947	0,00879	8128	8758
GX 0,30%	900	1000,42	1109,63	0,00809	0,00749	10710	11563
GX 0,30%	1000	1210,99	1346,43	0,00702	0,00649	13706	14825
GX 0,35%	600	437,43	477,96	0,01621	0,01512	3562	3821
GX 0,35%	700	568,33	623,04	0,01319	0,01226	5111	5496
GX 0,35%	800	713,00	783,88	0,01102	0,01023	6987	7530
GX 0,35%	900	870,89	959,88	0,00941	0,00872	9206	9941
GX 0,35%	1000	1041,53	1150,56	0,00817	0,00755	11782	12746

Observa-se na Tabela 4.3 que ambas as correlações, equações 4-8 e 4-9, propostas para as vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm, definem o regime turbulento no biorreator com número de Reynolds superior a 5×10^3 .

4.1.1 Comparação entre as correlações propostas e as fornecidas pela literatura para velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$)

Calculou-se para as várias correlações propostas na literatura, a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), fixando-se para comparação a concentração intermediária de goma xantana de 0,25 % m/v (fluido não-Newtoniano), que corresponde aos valores de índice de consistência (K) e de índice de comportamento do escoamento do fluido de 1,008 Pa.sⁿ e 0,28, respectivamente.

A velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e a máxima ($\dot{\gamma}_{m_{ax}}$) para algumas das correlações da literatura (equação 2-14: Metzner e Otto, 1957; equação 2-15: Calderbank e Moo-Young 1959; equação 2-1: Wichterle *et al.*, 1984; equação 2-20: Kelly e Gigas, 2003; equação 2-21: Pérez *et al.*, 2006) foram utilizadas para a comparação com as equações 4-8 e 4-9, propostas no presente trabalho para vazões específicas de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm respectivamente.

Na Tabela 4.4 estão apresentados os resultados, sendo os mesmos ilustrados na Figura 4.12. Os cálculos para as velocidades de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e a máxima ($\dot{\gamma}_{m_{ax}}$) foram realizados para frequência de rotação do impelidor (N) na unidade de rps, no entanto, na Tabela 4.4 e na Figura 4.12, a frequência de rotação do impelidor (N) está em rpm, para facilitar a visualização.

Tabela 4.4. Valores das velocidades de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) para as correlações presentes na literatura e para as correlações propostas no presente trabalho.

N rpm	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) 0,50 vvm	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) 1,00 vvm	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) Eq. 2-14	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) Eq. 2-15	$\dot{\gamma}_{m_{ax}}$ (s ⁻¹) Eq. 2-16	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) Eq. 2-20	$\dot{\gamma}_m$ (s ⁻¹) Eq. 2-21
600	446,63	492,01	116,00	140,70	166605	643,00	831,43
700	595,25	658,10	135,33	164,15	239108	750,17	1031,70
800	763,42	846,68	154,67	187,60	326974	857,33	1243,78
900	950,78	1057,40	174,00	211,05	430925	964,50	1466,75
1000	1157,03	1289,97	193,33	234,50	551627	1071,67	1699,87

Os perfis de velocidades de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e máxima ($\dot{\gamma}_{max}$) obtidos para as correlações estão ilustrados na Figura 4.12.

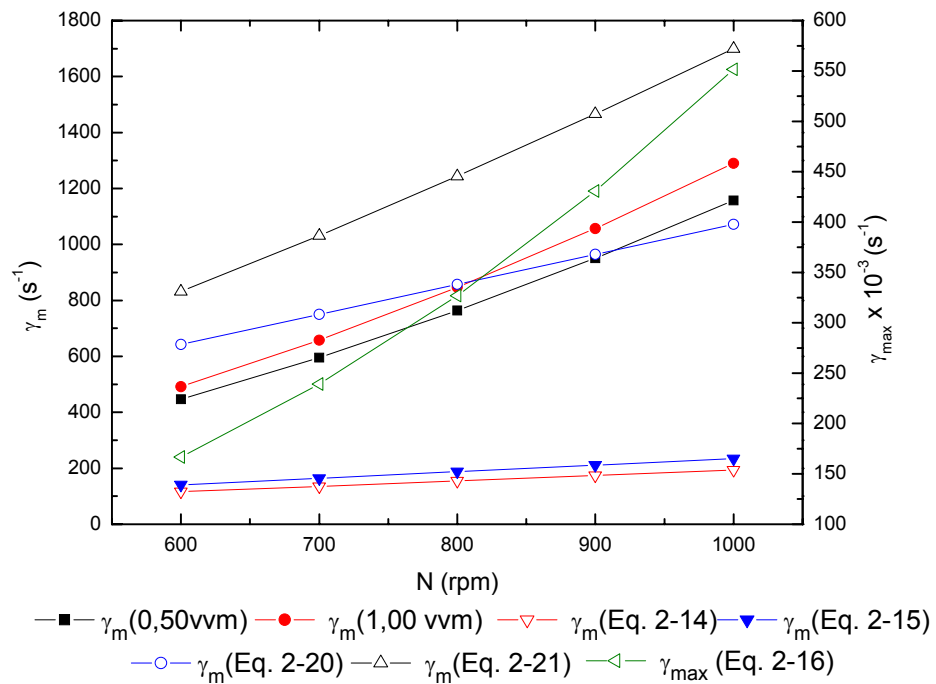


Figura 4.12. Comparação entre os valores das velocidades de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e máxima ($\dot{\gamma}_{m_{ax}}$) obtidas por diferentes correlações.

As equações 2-14 e 2-15 foram obtidas no regime laminar e as equações 2-20 e 2-21 no regime de transição e foram extrapoladas para o regime turbulento para efeito de comparação.

Para o cálculo da velocidade de cisalhamento média (γ_m), a constante de proporcionalidade (k) das equações 2-14 e 2-15 foi assumida ser de 11,6.

Observa-se na Figura 4-12 que as correlações para a velocidade de cisalhamento média (γ_m) propostas por Metzner e Otto (1957) e Calderbank e Moo-Young (1959) por terem sido obtidas no regime laminar e extrapoladas para o regime turbulento subestimaram os valores quando comparado com as demais correlações.

Nota-se que os valores previstos pelas correlações para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 e 1,00 vvm, situaram-se entre aqueles gerados pelas correlações de Kelly e Gigas (2003) e Pérez *et al.* (2006), indicando que a metodologia proposta gerou valores de γ_m próximos aos da literatura e, portanto, validando a mesma.

Verifica-se na Figura 4-12 que a correlação para a velocidade de cisalhamento máxima (γ_{max}) de Wichterle *et al.* (1984) obtida na ponta do impelidor foi três ordens de grandeza superior aos valores das demais correlações para a velocidade de cisalhamento média (γ_m).

As velocidades de cisalhamento média (γ_m) e a máxima (γ_{max}) no biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado são esperados serem dependentes, além da frequência de rotação do impelidor (N), das propriedades reológicas do fluido, em particular do índice de consistência e do índice de comportamento do escoamento do fluido (K e n) (Robertson e Ulbrecht, 1987). As correlações para a velocidade de cisalhamento média (γ_m) propostas por Metzner e Otto (1957), Kelly e Gigas (2003) e Pérez *et al.* (2006) para biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado são apresentadas em função apenas da frequência de rotação do impelidor (N). De acordo com Chisti (2001), a velocidade de cisalhamento é dependente da capacidade de transferência de quantidade de movimento do fluido, ou seja, da densidade e da viscosidade do fluido. Portanto, correlações que expressem a velocidade de cisalhamento média

(γ_m) ou máxima (γ_{max}) como função apenas da frequência de rotação do impelidor (N) estão incompletas.

Assim sendo, pode-se afirmar que as correlações para a velocidade de cisalhamento média (γ_m) propostas no presente trabalho são mais adequadas e completas, pois consideram a frequência de rotação do impelidor (N) e as propriedades reológicas do fluido (K e n) nas previsões das condições de cisalhamento.

4.2 Influência das condições de cisalhamento nas variáveis de cultivo

Com o objetivo de avaliar a influência das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* foram realizados quatro cultivos com as mesmas composições de meios de cultivo e condições: pH de 6,8, temperatura de 28°C e aeração igual a 0,5 vvm, no entanto, os cultivos foram realizados sob diferentes condições de agitação, a saber, 700, 800, 900 e 1000 rpm.

Os resultados obtidos para o índice de consistência (K), índice de comportamento de escoamento (n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (C_{Glic}) e concentração de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo (OD) estão ilustrados em função do tempo para cada cultivo nas Figuras 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16.

Na Figura 4.13 encontram-se os resultados obtidos no cultivo C1 realizado sob frequência de agitação de 700 rpm.

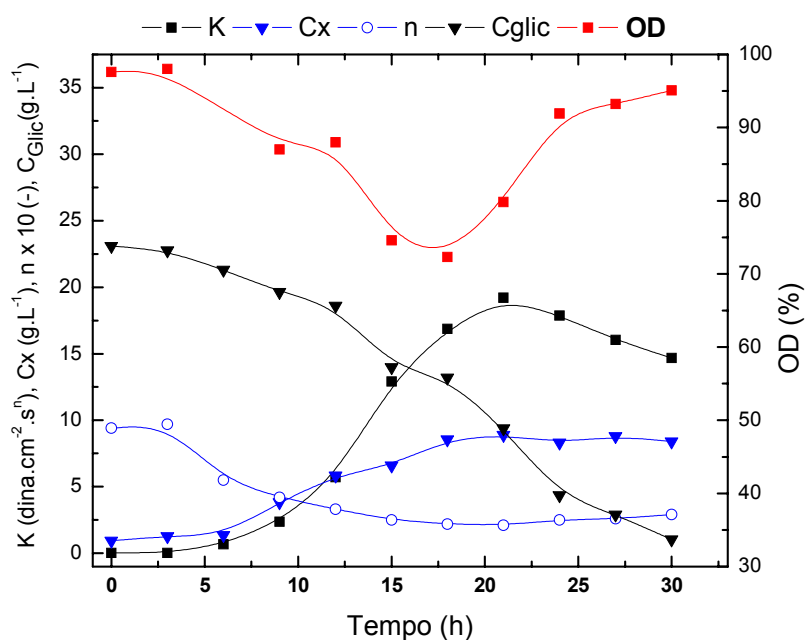


Figura 4.13. Resultados do cultivo C1 (700 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.

Observa-se que não houve limitação por falta de oxigênio durante o cultivo C1, atingindo o valor mínimo de 72,3 % em 18 horas de cultivo. O índice de consistência e a concentração celular alcançaram os valores máximos de 19,22 dina.cm⁻².sⁿ e 8,90 g.L⁻¹ e o índice de comportamento de escoamento o valor mínimo de 0,21 em 21 horas de cultivo. O experimento C1 iniciou com concentração de glicerol de 23,1 g.L⁻¹, substrato limitante totalmente consumido em 30 horas de cultivo.

Na Figura 4.14 encontram-se os resultados obtidos no cultivo C2 realizado sob agitação de 800 rpm.

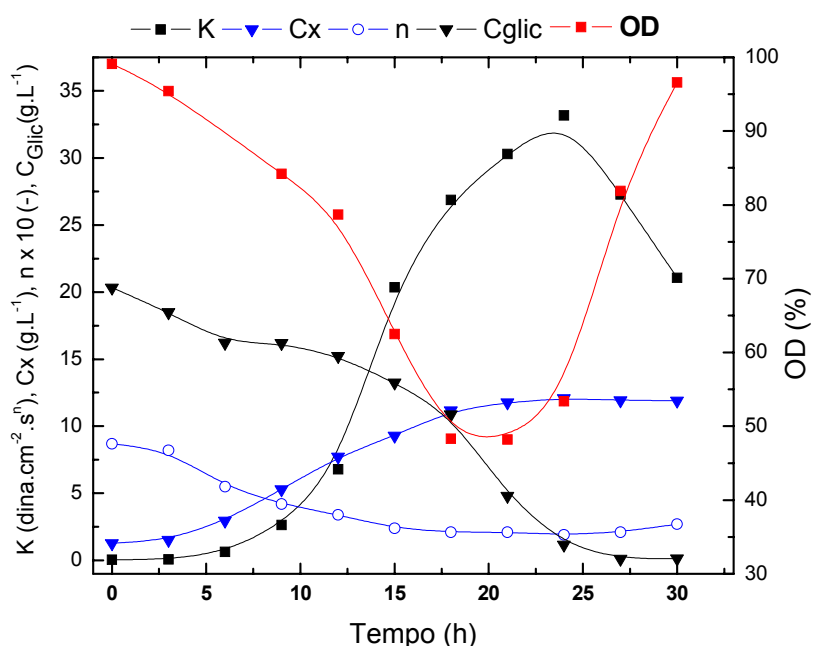


Figura 4.14. Resultados do cultivo C2 (800 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.

Observa-se novamente que não houve limitação por falta de oxigênio durante o cultivo C2. A concentração de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo alcançou um valor mínimo de 50 % em 18 horas de cultivo. O índice de consistência (K) e a concentração celular atingiram seus valores máximos em 24 horas de cultivo, $33,17 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ e $12,08 \text{ g.L}^{-1}$, juntamente com o valor mínimo do índice de comportamento de escoamento do fluido de 0,19. A fonte de carbono foi também consumida totalmente em 30 horas de cultivo.

Na Figura 4.15 encontram-se os resultados obtidos no cultivo C3 realizado sob agitação de 900 rpm.

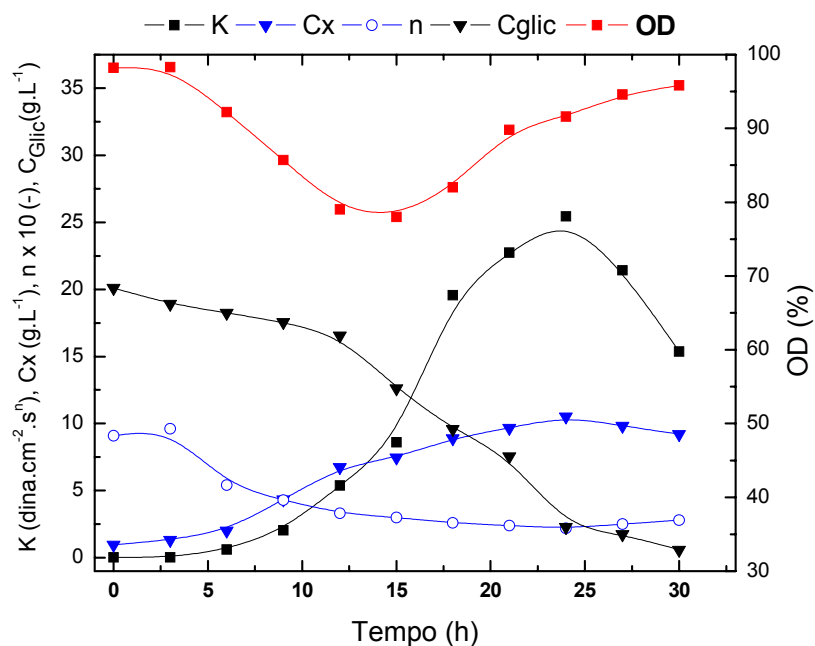


Figura 4.15. Resultados do cultivo C3 (900 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.

O valor mínimo de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo foi de 78 %, obtido em 15 horas de cultivo. Observa-se que a concentração de glicerol alcançou o valor mínimo em 30 horas de cultivo.

Como verificado nos resultados dos cultivos anteriores, o índice de consistência (K) e a concentração celular (Cx) também atingiram os valores máximos ao mesmo tempo, 25,43 dina.cm².sⁿ e 10,52 g.L⁻¹, em 24 horas de cultivo. Neste mesmo tempo, o valor mínimo do índice de comportamento de escoamento do fluido foi de 0,22.

Na Figura 4.16 encontram-se os resultados obtidos no cultivo C4 realizado sob agitação de 1000 rpm.

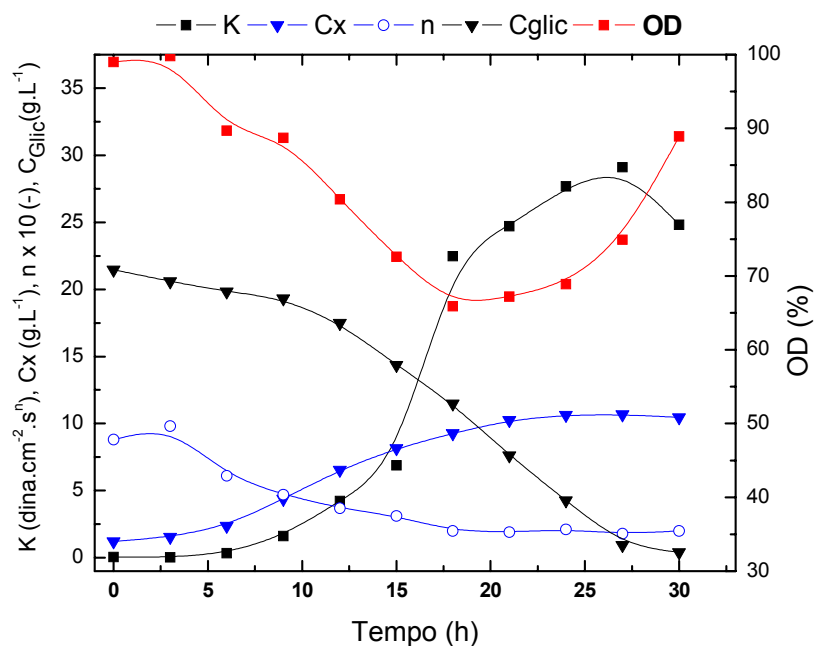


Figura 4.16. Resultados do cultivo C4 (1000 rpm) no biorreator tipo tanque agitado.

Pode-se notar na Figura 4.16 que não houve limitação por falta de oxigênio dissolvido durante o cultivo e os valores máximos do índice de consistência (K) e da concentração celular (Cx) foram respectivamente de 29,11 dina.cm².sⁿ e 10,68 g.L⁻¹ em 27 horas de cultivo. A fonte de carbono foi completamente consumida em 30 horas de cultivo.

Em relação à quantidade molar de dióxido de carbono produzido, produto da respiração celular, em função do tempo, na Figura 4.17 está ilustrado o perfil obtido para cada cultivo.

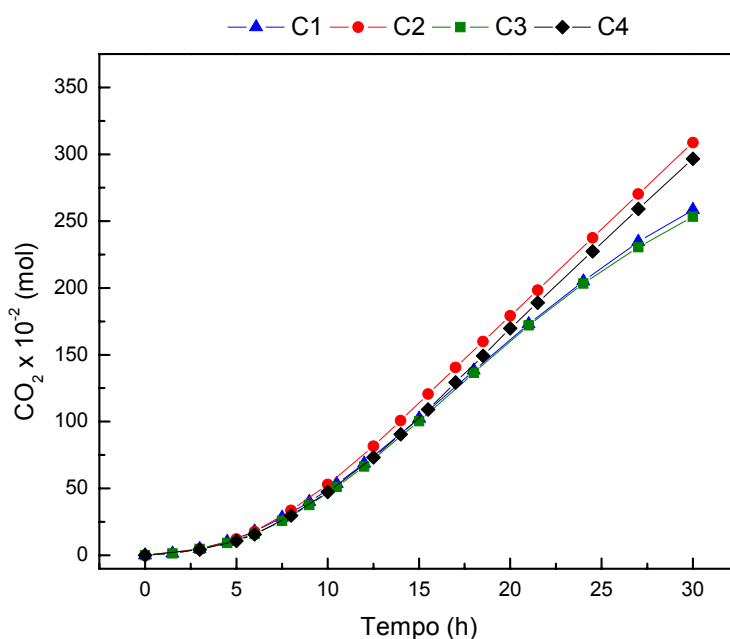


Figura 4.17. Dióxido de carbono produzido (mol) em função do tempo (h).

Observa-se pela Figura 4.17 que os cultivos apresentaram quantidades de dióxido de carbono muito próximas, não sendo esta variável diretamente influenciada pelas condições de cisalhamento.

4.2.1 Comparação das variáveis de processo obtidas durante os cultivos.

As variações nas variáveis do processo como índice de consistência (K), concentração celular (Cx), índice de escoamento (n) e consumo de glicerol são decorrentes das condições de cisalhamento impostas aos cultivos.

Nas Figuras 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21, as variáveis do processo estão normalizadas, ou seja, divididas pelo valor máximo obtido durante o cultivo. A normalização das variáveis se fez necessária para eliminar a influência causada pelas diferentes condições iniciais dos cultivos,

como as concentrações de glicerol e de inóculo, uma vez que se pretende efetuar comparações entre os cultivos.

A Figura 4.18 mostra o índice de consistência normalizado em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

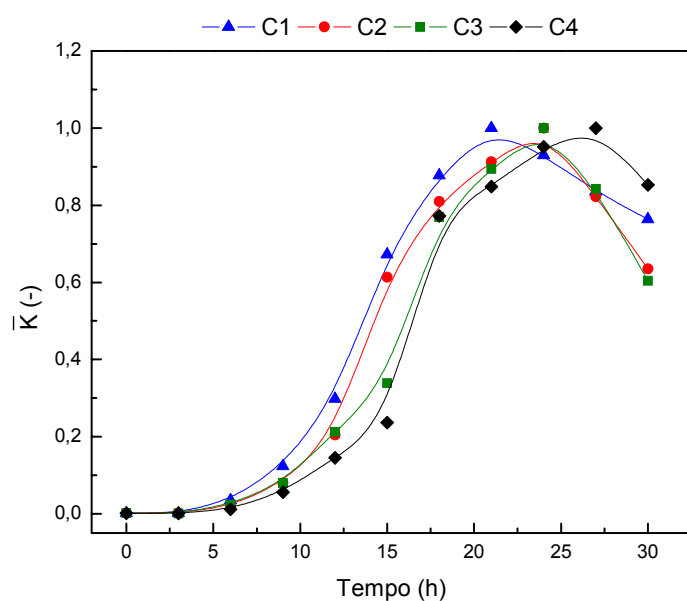


Figura 4.18. Perfis do índice de consistência normalizado para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

Como ilustrado na Figura 4.18, os índices de consistência normalizados alcançaram os valores máximos em 21, 24, 24 e 27 horas de cultivo nos experimentos C1, C2, C3 e C4, respectivamente. Este fato mostra que quanto maior a frequência de rotação do impelidor (N) maior foi a dificuldade do microrganismo atingir o valor máximo do índice de consistência, resultando no prolongamento do cultivo. Além disso, observa-se também que, durante toda a fase de crescimento do microrganismo, o índice de consistência normalizado foi maior para as menores condições de agitação imposta, havendo desta forma, uma relação inversa com a velocidade de cisalhamento.

O índice de consistência do fluido (K) é uma variável quantitativa e qualitativa do processo, sendo influenciado pela velocidade de cisalhamento. Quantitativa porque depende da concentração celular, como observado na equação 2-13, proposta por Badino *et al.* (1999), e qualitativa porque depende do crescimento e morfologia do microrganismo (pellets, micélio livre ou fragmentado).

Os perfis de concentração celular normalizada (\bar{C}_x) em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4 estão apresentados na Figura 4.19.

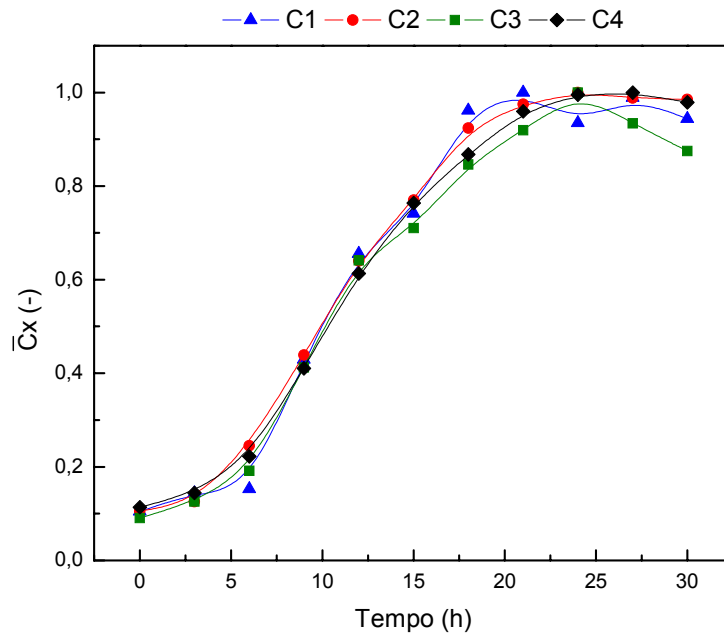


Figura 4.19. Perfis de concentração celular normalizada (\bar{C}_x) em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

Os perfis de concentração celular normalizada (\bar{C}_x) durante os cultivos foram similares, obtendo-se os valores máximos em 21, 24, 24 e 27 horas de cultivo nos experimentos C1, C2, C3 e C4, respectivamente.

O que ocorreu para o índice de consistência normalizado (\bar{K}) foi também observado para a concentração celular normalizada (\bar{C}_x). Nos experimentos com maior frequência de rotação do impelidor (N) (maior velocidade de cisalhamento) levaram mais tempo para atingir o valor máximo da concentração celular normalizada (\bar{C}_x), fazendo com que o tempo de cultivo fosse prolongado. Isso ocorreu porque a concentração celular (C_x) é uma variável quantitativa e quanto maior foi a frequência de rotação do impelidor (N), maior o grau de cisalhamento, dificultando o crescimento celular e o alcance da concentração celular máxima.

A Figura 4.20 ilustra os perfis dos índices de comportamento do escoamento do fluido normalizado (\bar{n}) pelo tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

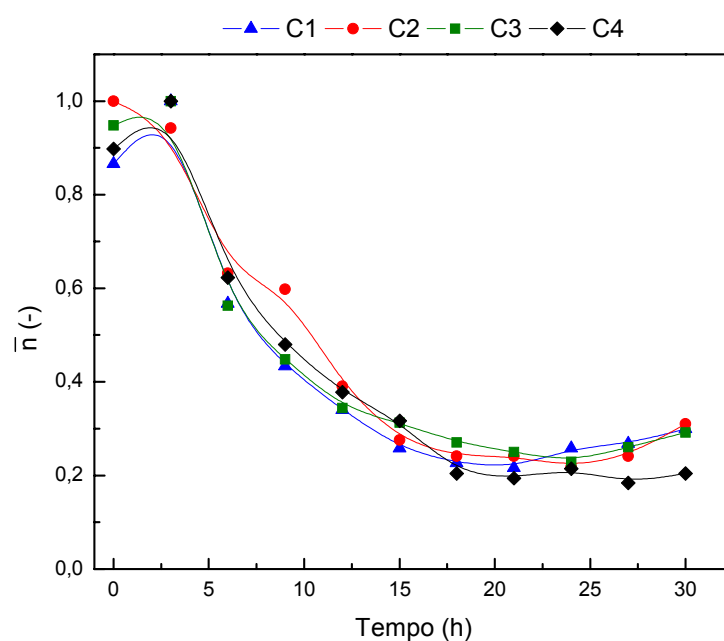


Figura 4.20. Perfis do índice do comportamento de escoamento do fluido normalizado (\bar{n}) em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

Analisando a Figura 4-20, nota-se que os valores do índice de comportamento do escoamento normalizado (\bar{n}) para os cultivos C1, C2, C3 e C4 atingiram os valores mínimos em

21, 24, 24 e 27 horas de cultivos. Desta forma, pode-se considerar que o índice de comportamento do escoamento do fluido (n) foi influenciado pela frequência de rotação do impelidor (N), já que esta é uma variável qualitativa do processo, dependendo da forma morfológica em que se encontra o microrganismo, pellets ou micélios com diferentes graus de fragmentação ou ruptura.

Os perfis de concentração de glicerol normalizada (\bar{C}_{glic}) para os quatro cultivos estão ilustrados na Figura 4.21.

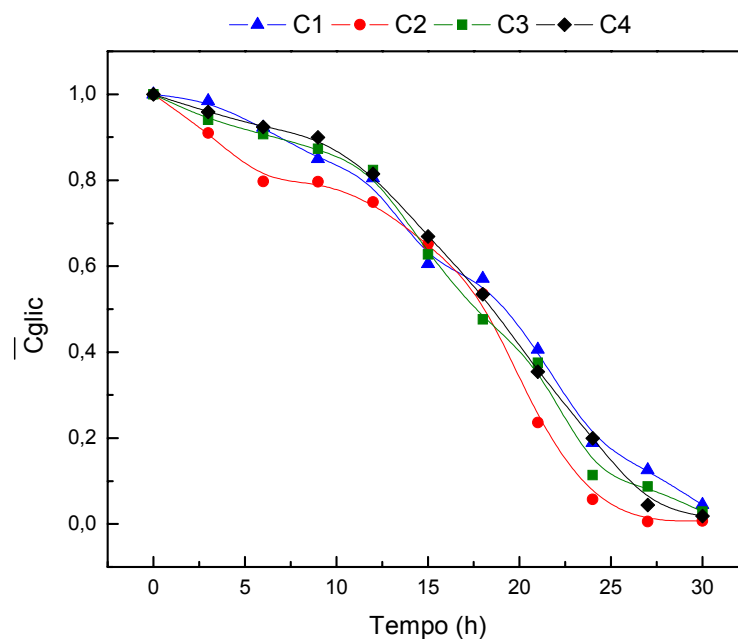


Figura 4.21. Perfis da concentração de glicerol normalizada (\bar{C}_{glic}) para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

Comparando-se os perfis da concentração de glicerol normalizada (\bar{C}_{glic}), observa-se que não houve uma tendência clara da influência da frequência de rotação do impelidor (N) na cinética de consumo de glicerol. A 800 rpm o consumo da fonte de carbono foi mais rápido que

os demais cultivos, devido à maior concentração celular. Contudo, os perfis da concentração de glicerol normalizada (\bar{C}_{glic}) para os cultivos estão muito próximos.

Como pode ser observado nas Figuras 4.18 e 4.19 existem relações entre a velocidade de cisalhamento e o índice de consistência normalizado (\bar{K}) e a concentração celular normalizada (\bar{C}_x). De tal forma que, multiplicando os valores dos índices de consistência normalizados (\bar{K}) pelas concentrações celulares normalizadas (\bar{C}_x), obtém-se o parâmetro ε , que está apresentado na Figura 4.22 em função do tempo para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

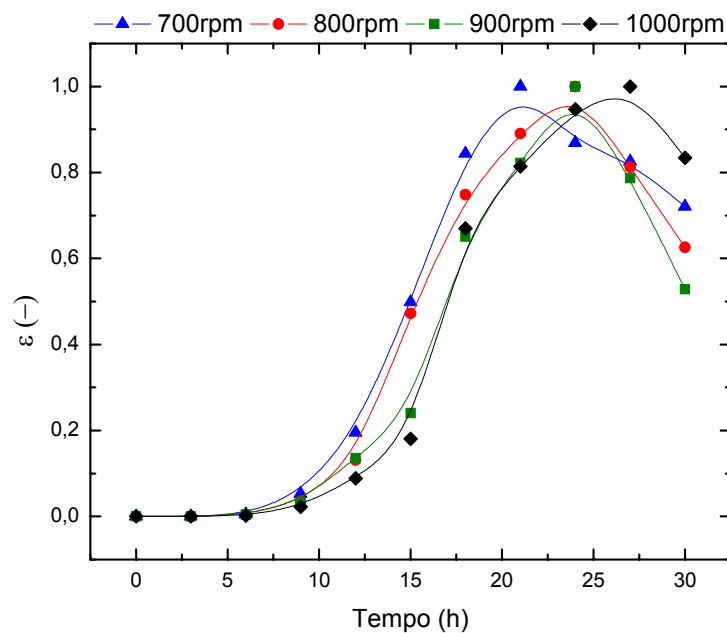


Figura 4.22. Perfis do índice de consistência normalizado (\bar{K}) multiplicado pela concentração celular normalizada (\bar{C}_x) para os cultivos C1, C2, C3 e C4.

Nota-se que para um determinado tempo do cultivo, durante a fase de crescimento do microrganismo, o fator ε diminui com o aumento da frequência de rotação do impelidor (N) e para um valor de ε constante os tempos dos cultivos foram maiores para velocidades de cisalhamento maiores. Para ε igual a 0,20, por exemplo, os experimentos C1, C2, C3 e C4

tiveram os tempos de 11.7, 12.4, 13.6 e 14.4 horas, respectivamente. Em relação ao valor máximo de ε , os experimentos C1, C2, C3 e C4 atingiram os valores máximos em 21, 24, 24 e 27 horas de cultivos. Isso significa que o produto do índice de consistência normalizado (\bar{K}), parâmetro relacionado com a morfologia celular, pela concentração celular normalizada (\bar{C}_x), parâmetro quantitativo, foi influenciado pela frequência de rotação do impelidor (N), e portanto, influenciando na cinética desses.

Na seqüência, calculou-se a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função do tempo para os quatro cultivos, aplicando a correlação proposta no presente trabalho, equação 4-8 para vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,50 vvm. A Figura 4-23 ilustra os perfis obtidos para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função do tempo.

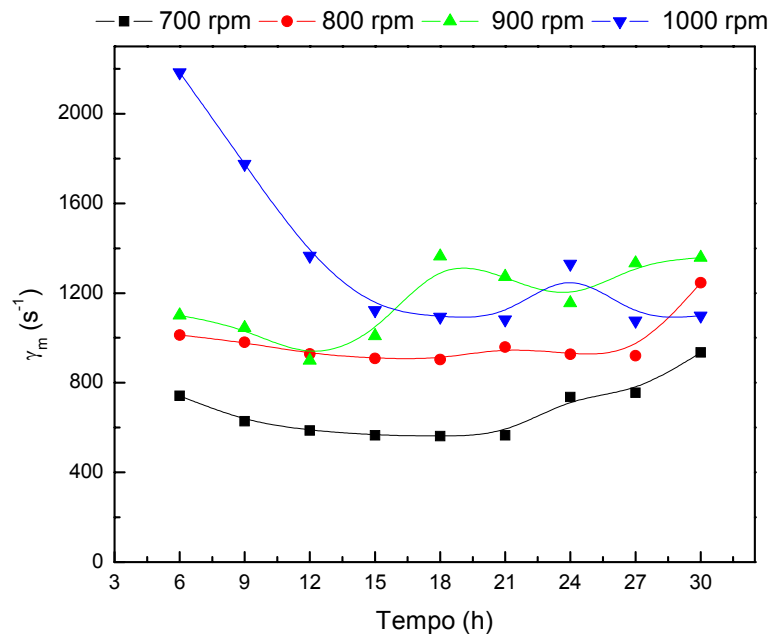


Figura 4-23. Perfis da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função do tempo para os quatro cultivos

No início dos cultivos, para índices de comportamento do escoamento (n) muito próximo de 1 (0 e 3 horas de cultivo) obtiveram-se valores de velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) muito altos, por isso na Figura 4-23 os perfis das velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) iniciaram em 6 horas de cultivo.

Nota-se na Figura 4-23, que a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) diminuiu com o crescimento do microrganismo. Com a diminuição do crescimento celular e o aumento da morte microbiana, a viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) diminuiu e a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) começou a aumentar no final dos cultivos.

Em relação ao cultivo realizado com a maior frequência de rotação do impelidor (N) (1000 rpm), observaram-se maiores valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) e uma queda acentuada nas quinze primeiras horas do cultivo. A queda acentuada e os maiores valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) foram causados pelo baixo valor da viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}) e pela alta frequência de rotação do impelido (N) que elevam o número de Reynolds e aumentam a capacidade de transferência de quantidade de movimento. Na verdade, a frequência de rotação do impelidor (N) determina o cisalhamento e a fragmentação das células, isso acaba por diminuir a viscosidade aparente (μ_{ap}) e o índice de consistência (K) e, por conseqüência, o aumento do cisalhamento e a transferência de quantidade de movimento.

Observou-se que a correlação para a velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) em função das propriedades reológicas (K e n) e da frequência de rotação do impelidor (N), dada pela equação 4-8, é muito sensível ao índice de comportamento do escoamento do fluido (n). Pequenas variações em n fornecem $\dot{\gamma}_m$ muito diferentes. Possivelmente, o perfil da velocidade de

cisalhamento média (γ_m) para o cultivo realizado na agitação de 900 rpm tenha sofrido as oscilações observadas.

Contudo, com a correlação proposta no presente trabalho pode-se estimar os valores de γ_m nos quatro cultivos realizados. Além disso, pode-se observar que a velocidade de cisalhamento média (γ_m) não depende apenas da frequência de rotação do impelidor (N), mas também das propriedades reológicas do fluido (K e principalmente n). Segundo Chisti (2001), correlações que levam em consideração as propriedades reológicas são mais completas.

Por fim, pode-se verificar que para uma estimativa mais precisa da velocidade de cisalhamento média (γ_m) nos cultivos, deveria-se obter uma correlação de γ_m utilizando os valores de N, K, n e k_{La} obtidos nos próprios cultivos.

4.3 Determinação da velocidade de cisalhamento média (γ_m) em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* utilizando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

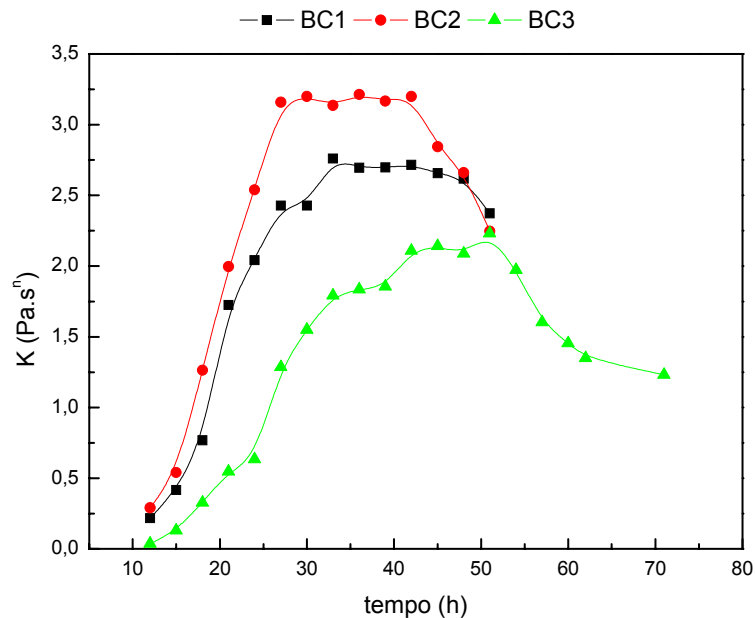
Tal como citado no item Revisão Bibliográfica, Rosa (2002) realizou três cultivos com as mesmas composições de meios de cultivo e condições de pH, temperatura e vazão de alimentação de ar, no entanto, os cultivos foram realizados sob diferentes condições de agitação, 600, 800 e 1000 rpm em um biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado (Bioflo III – New Brunswick Sci. Co. Inc., USA), com volume útil de 4 litros. Na Tabela 4.5 estão especificadas as condições de agitação e aeração empregadas em cada cultivo.

Tabela 4.5. Condições de operação dos cultivos BC1, BC2 e BC3.

Cultivo	Rotação (rpm)	Vazão (vvm)
BC1	600	0,50
BC2	800	0,50
BC3	1000	0,50

Os valores do índice de consistência (K), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), índice de escoamento do fluido (n) obtidos durante os cultivos, bem como os valores calculados de velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), com base na equação 3-4, estão ilustrados em função do tempo para cada cultivo nas Figuras 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27, respectivamente. Cabe ressaltar que durante os três experimentos não houve limitação por falta de oxigênio.

Na Figura 4.24 encontram-se os perfis do índice de consistência (K) obtidos nos cultivos.

Figura 4.24. Perfis do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos BC1, BC2 e BC3.

O experimento BC2 produziu os maiores valores do índice de consistência (K), indicando que, sob tais condições de operação, 800 rpm e 0,50 vvm de ar, o microrganismo encontrou o ambiente mais propício para o seu crescimento, gerando um caldo mais consistente. No cultivo BC3, a intensa condição de cisalhamento durante a batelada afetou negativamente o crescimento celular, sendo que os menores valores do índice de escoamento (K) obtidos para o BC3 indicam o rompimento celular devido à alta tensão de cisalhamento, fazendo com que o crescimento celular ocorresse mais lentamente. Quanto ao cultivo BC1, a menor condição de agitação (600 rpm) talvez não tenha determinado uma boa mistura e dispersão de nutrientes, fazendo com que o perfil de K com o tempo seja inferior àquele obtido no cultivo BC2.

Na seqüência, valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), obtidos por Rosa (2002) pelo método do balanço gasoso, são apresentados ao longo dos tempos dos cultivos. Observa-se que durante as primeiras horas dos cultivos, os valores obtidos de k_{La} não foram coerentes devido às baixas sensibilidades dos equipamentos nas medidas das frações molares de oxigênio e de dióxido de carbono no gás efluente do biorreator, ocorrendo grandes oscilações nos valores de k_{La} nos inícios dos experimentos. Por isso, optou-se pela apresentação dos dados a partir de 12 horas de cultivo. A Figura 4.25 ilustra os valores dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio obtidos durante os cultivos.

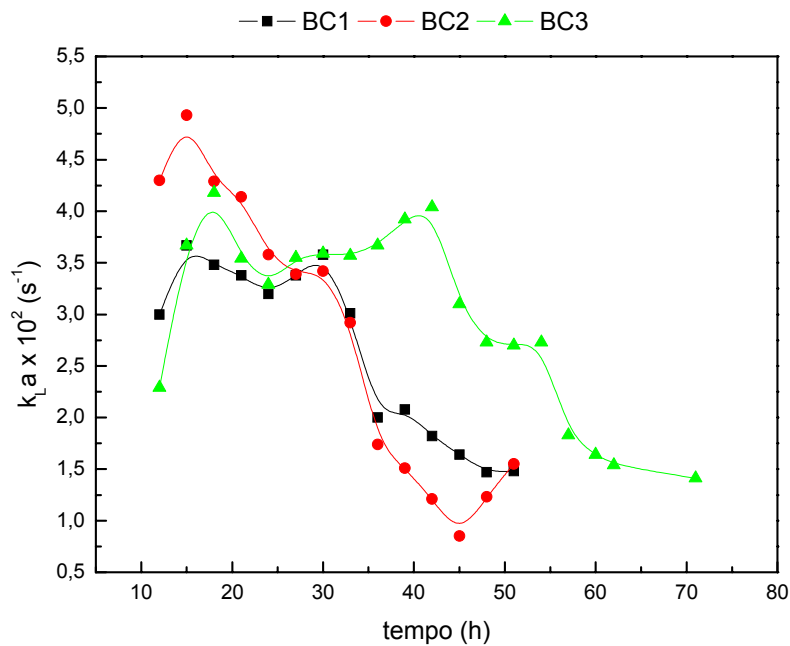


Figura 4.25. Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.

Observa-se na Figura 4.25 que o perfil do $k_{L,a}$ do experimento BC3, até 33 horas de cultivo, não apresenta um comportamento que condiz com as condições de operação. O perfil do $k_{L,a}$ neste intervalo de tempo deveria estar acima do obtido para o experimento BC2, pois quanto maior a frequência de rotação do impelidor (N), menor é o índice de consistência (K), o que deveria proporcionar uma maior transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Nota-se também no experimento BC3, que os valores de $k_{L,a}$ deveriam aumentar a partir de 54 horas de cultivo, uma vez que, quando o índice de consistência (K) diminui, a transferência de oxigênio deveria aumentar. Provavelmente, deve ter ocorrido algum problema associado às medidas das frações molares de O_2 e CO_2 .

Em relação ao índice de escoamento do fluido (n), a Figura 4.26 mostra a variação de n com o tempo para os três experimentos.

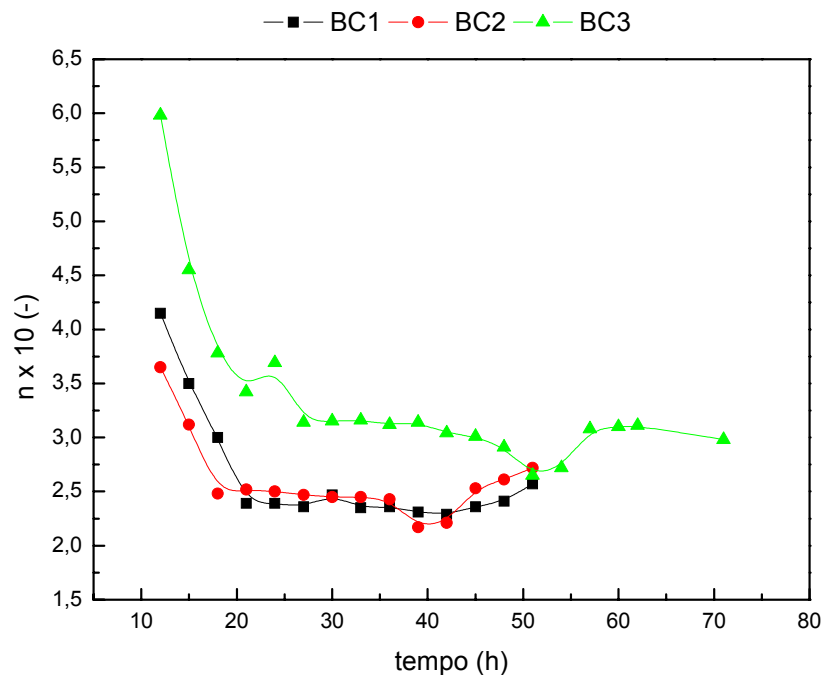


Figura 4.26. Perfis do índice de escoamento do fluido (n) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.

A Figura 4.26 mostra uma diminuição no índice de escoamento do fluido (n) durante a fase de crescimento celular e um aumento com o término do glicerol. Além disso, pode-se observar também, que o n foi influenciado pela frequência de rotação do impelidor (N), pois quanto maior o N maior foi este parâmetro reológico.

A velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) foi calculada utilizando a equação 3-4 com os valores das constantes a , b e c determinadas para vazão de alimentação de ar de 0,50 vvm. A substituição dos valores das constantes na equação 3-4 resultou na equação 4-13.

$$\dot{\gamma}_m = \left(\frac{1}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \cdot \left(\frac{k_L a}{5,6 \cdot 10^{-4} \cdot N^{0,8179}} \right)^{\frac{1}{-0,3477 \cdot (n-1)}} \quad \text{Eq. 4-13}$$

Esta correlação fornece uma estimativa mais precisa da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) nos cultivos, porque utiliza os valores de N , K , n e $k_L a$ obtidos diretamente dos cultivos. As

variações de $\dot{\gamma}_m$ ao longo dos cultivos estão apresentadas na Figura 4.27 para os experimentos BC1, BC2 e BC3.

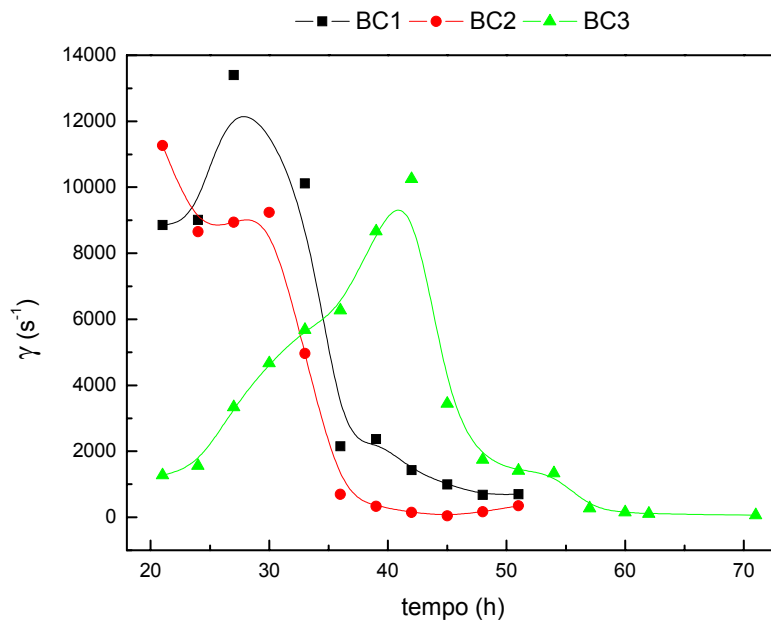


Figura 4.27. Perfis da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) obtidos nos cultivos BC1, BC2 e BC3.

Verifica-se através da Figura 4.27, que os valores da velocidade de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$) para BC1 foram maiores do que os valores do BC2, apesar da menor frequência de rotação do impelidor (N). De fato, a velocidade de rotação do impelidor é a grande responsável pelo cisalhamento do microrganismo. No entanto, quanto maior a viscosidade aparente (μ_{ap}) do fluido, menor é o valor de $\dot{\gamma}_m$, observando-se desta forma, uma inversão de valores.

Em relação ao experimento realizado a 1000 rpm, esperava-se os maiores valores de $\dot{\gamma}_m$ com uma diminuição contínua durante a fase de crescimento e um aumento na fase de morte do microrganismo. No entanto, no intervalo das 21 às 36 horas de cultivo houve um aumento e a partir das 54 horas uma diminuição nos valores de $\dot{\gamma}_m$. Os resultados obtidos no cultivo BC3

devem-se aos valores dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio que aumentaram das 21 às 42 horas, ao invés de diminuírem, e continuaram diminuindo a partir das 54 horas, ao invés de aumentarem.

A determinação das velocidades médias de cisalhamento (γ_m) em meios com microrganismo vivo (*Streptomyces clavuligerus*) é complexa. Experimentos com sistemas não biológicos isentos de células (goma xantana e glicerol) geram relações esperadas entre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e parâmetros reológicos do sistema. Entretanto, um sistema não-biológico é incapaz de representar todos os efeitos que influenciam o crescimento do microrganismo. Por isso, a determinação de valores de γ_m em sistemas biológicos é um fator muito importante para o desenvolvimento dos cultivos e, conseqüentemente, para a produção de um produto de interesse comercial.

5. CONCLUSÕES

A metodologia empregada no biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado para correlacionar a velocidade de cisalhamento média (γ_m) com a frequência de rotação do impelidor (N) e as propriedades reológicas (K e n) mostrou-se coerente. Os valores obtidos para a velocidade de cisalhamento média (γ_m) ficaram próximos aos valores dados por correlações presentes na literatura.

A correlação obtida para a velocidade de cisalhamento média (γ_m) por estar em função da frequência de rotação do impelidor (N) do índice de consistência (K) e do índice de comportamento do escoamento do fluido (n), mostrou-se mais adequada e completa que as demais correlações que dependem apenas da frequência de rotação do impelidor (N), pois é esperado, que a velocidade de cisalhamento média (γ_m) ou a máxima (γ_{max}) sejam dependentes da capacidade de transferência de quantidade de movimento do fluido, e desta forma, da reologia e da densidade do fluido.

Com relação à influência das condições de cisalhamento nos quatro cultivos de *Streptomyces clavuligerus* com as mesmas composições de meios de cultivo e condições de pH, temperatura e aeração, mas sob diferentes condições de cisalhamento, conclui-se que a normalização das variáveis do processo eliminou a influência das concentrações iniciais de glicerol e de inóculo para efetuar a comparação entre os cultivos.

A velocidade de cisalhamento média (γ_m) exerceu influência no índice de consistência do fluido (K), por ser um parâmetro relacionado com a morfologia celular e a quantidade de microrganismo presente no cultivo, bem como influenciou o índice de comportamento de escoamento, por afetar a vitalidade estrutural do microrganismo e, por fim, influenciou a

concentração celular, uma variável quantitativa do processo, prejudicando o crescimento do microrganismo.

Com a correlação obtida na primeira etapa do presente trabalho a velocidade de cisalhamento média (γ_m) pode ser estimada com base nos valores experimentais dos quatro cultivos. Os maiores valores de velocidade de cisalhamento média (γ_m) foram obtidos para o cultivo C4 (1000 rpm) e os menores valores para o C1 (700 rpm), além disso, constatou-se que, γ_m diminui com a viscosidade aparente do fluido (μ_{ap}). Conclui-se, portanto, que altos valores de cisalhamento geram caldos fermentativos menos viscosos com conseqüente aumento nas velocidades de cisalhamento médias (γ_m), atrasando os términos dos cultivos.

Por fim, fazendo-se uso da metodologia proposta foi possível avaliar as influências das condições de cultivo e de transferência de oxigênio nos perfis de velocidade de cisalhamento ao longo de cultivos de *S. clavuligerus*, podendo-se concluir que a determinação de γ_m utilizando informações diretas dos cultivos (N, K, n e k_{La}) gera resultados mais fidedignos acerca das condições de cisalhamento impostas aos microrganismos.

6. CONTINUIDADE DO TRABALHO

Propõem-se para a continuidade do trabalho a realização de 5 cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado mantendo as mesmas condições de temperatura, pH, vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) e composição do meio, mas variando a frequência de rotação do impelidor (N) em 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm. Nesses cultivos, propõe-se determinar os perfis da velocidade de cisalhamento média (γ_m) através da substituição direta dos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), obtidos ao longo dos cultivos, na correlação proposta e verificar a influência do cisalhamento na produção de compostos β -lactâmicos como a cefamicina C e o ácido clavulânico. Propõe-se também a realização de um planejamento experimental para determinar a condição de operação ótima para a produção do produto de interesse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADINO, A. C. **Reologia, consumo de potência e transferência de oxigênio em cultivo descontínuo de *Aspergillus awamri* NRRL 3112**. 1997. Tese de Doutorado, PPG-EQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 1997.

BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochem. Eng. J.**, v. 8, p. 111-119, 2001.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Bioch. Eng.** New York: MCGraw Hill, cap. 8, 1986.

BALLOWS, A. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 1992. v. 1.

BLAŽEJ, J. M.; ANNUS, J.; MARKOŠ, J. Measurement of mass transfer coefficient in an airlift reactor with internal loop using coalescent and non-coalescent liquid media. **J. Chem. Tech. and Biotech.**, v. 79, p. 1405-1411, 2004.

BOWEN, R. Unraveling the mysteries of shear-sensitive mixing systems. **Chem. Eng. J.**, v. 9, p. 55-63, 1986.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E.J.; **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York, Marcel Dekker, 1984. v.22, p.225-235.

CALDERBANK, P. H.; MOO-YOUNG, M. B. The prediction of power consumption in the agitation of non-Newtonian fluids. **Chem. Eng. Res. Des.**, v. 37, p. 26-33, 1959.

CHARLES, M. Fermenter design and scale-up. In: MOO-YOUNG, M.; **Comprehensive biotechnology: the principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Pergamon Press, USA, 1985. p.57-75.

CHARLES, M.; WILSON, J. Fermentor design. In: LYDERSEN, B. K.; D'ELIA, N. A.; NELSON, K. L.; **Bioprocess engineering systems, equipment and facilities**. John Willey & Sons, 1994. p. 3-67.

CHISTI, M.Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations. **Chem. Eng. Commun.**, v.60, p.195-242, 1989.

CHISTI, Y. Hidrodinamic damage to animal cells. **C. Rev. Biotech.**, v. 21, p. 67-110, 2001.

CONTRERAS, A. *et al.* Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. **Enz. Micr. Tech.**, v. 25, p. 820-830, 1999.

COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A.; MILLER, S. A. Performance of agitates gas-liquid contactors. **Ind. Eng. Chem.**, v. 36, n. 6, p. 504-509, 1944.

GAVRILESCU, M.; ROMAN, R. V.; EFIMOV, V. The volumetric oxygen mass transfer coefficient in antibiotic biosynthesis liquids. **Acta Biotech.**, v. 13, p.59-70, 1993.

KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocesses. In: MOO-YOUNG, M.; **Comprehensive biotechnology: the principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine.** Pergamon Press Inc., USA, 1985. p.6-54,

KAWASE, Y.; KUMAGAI, T. Apparent viscosity for non-Newtonian fermentation media in bioreactors. **Bioproc. Eng.**, v. 7, p. 25-28, 1991.

KELLY, W.; GIGAS, B. Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial-flow impellers operation gin the transitional flow regime. **Chem. Eng. Sci.**, v. 58, p. 2141-2152, 2003.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors. In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology**, v. 1-5, John Willey & Sons, Inc, p. 320-353, 1999.

METZNER, A. B.; OTTO, R. E. Agitation of non-newtonian fluids. **A. I. Chem. Eng. J.**, v.3, n.1, p. 3-10, 1957.

ONKEN, U.; WEILAND, P.; **Airlift fermenters: construction, behavior, and uses.** New York: Alan R. Liss, p.67-95, 1983.

PARADKAR, A.S.; AIDOO, K.A.; JENSEN, S.E. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Molec. Microb.**, v.27, n.4, p.831-843, 1998.

PÉREZ, J. A. R. *et al.* Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. **Chem. Eng. J.**, v. 124, p. 1-5, 2006.

PINTO, L. S. *et al.* Monitorização de processo biológico: análise digital de imagem, **Boletim de Biotec.**, 2002.

ROBERTSON, B.; ULBRECHT, J. J. Measurement of shear rate on an agitator in a fermentation broth. In: HO, C. S.; OLDSHUE, J. Y.; **Biotechnology processes, scale-up and mixing**, American Institute of Chemical Engineers, NY, 1987. p. 31-35.

ROSA, J. C. **Influência das condições de transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2002. Dissertação de Mestrado, PPG-EQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2002.

RYU, D. Y.; HUMPHREY, A. E. A Reassessment of oxygen transfer rates in antibiotics fermentation. **J. Ferment. Tech.**, v. 50, p. 424-431, 1972.

SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A.F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microb.**, v.142, p.1209-1220, 1996.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores In: SCHMIDELL, W. *et al.*; **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. v.2., cap. 14, 2001.

SCHÜGERL, K. **Bioreaction Engineering: characteristic features of bioreactors**. John Wiley & Sons, v.2, 1987.

WARREN, S. J. *et al.* Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. **Biotech. and Bioeng.**, v. 45, p. 80-85, 1995.

Wichterle, K. *et al.* Shear rates on turbine impeller blades. **Chem. Eng. Commun.**, v. 26, p. 25-32, 1984.

ZLOKARNIK, M. Sorption characteristics for gas-liquid contacting in mixing vessels. In: GHOSE, T. K.; FIECHTER, A.; BLAKERBROUGH, N.; **Advances in biochemical engineering**. 1978. v. 8, p. 133-151.