

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

AVALIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E MASSA DE  
UM BIORREATOR AIRLIFT DE CIRCULAÇÃO INTERNA DE  
BANCADA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Marcel Otavio Cerri

São Carlos – SP  
2005

AVALIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E MASSA DE  
UM BIORREATOR AIRLIFT DE CIRCULAÇÃO INTERNA DE  
BANCADA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

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

AVALIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E MASSA DE  
UM BIORREATOR AIRLIFT DE CIRCULAÇÃO INTERNA DE  
BANCADA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Marcel Otavio Cerri

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

São Carlos – SP  
2005

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

C417at

Cerri, Marcel Otávio.

Avaliação de transferências de calor e massa em biorreator Airlift de bancada para a produção de ácido clavulânico / Marcel Otávio Cerri. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

116 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Engenharia bioquímica. 2. Bioreatores pneumático. 3. Ácido clavulânico. 4. Streptomyces clavuligerus. 5. Massa – transferência. 6. Calor – transmissão. I. Título.

CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCEL OTAVIO CERRI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2005.

BANCA EXAMINADORA:

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

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

Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella  
AB/IPT

Dedico este trabalho aos meus pais por me apoiarem em todos os momentos e sempre dando oportunidade para eu chegar onde estou.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr. pela orientação deste trabalho, profissionalismo, amizade e paciência em ensinar.

Aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram para eu continuar estudando.

Ao Prof. Dr. Everaldo César Costa Araújo pelo auxílio nos cálculos de transferência de calor no biorreator airlift.

À minha namorada Adriana que desde que entrou na minha vida só tem trazido alegrias e entusiasmo, também pela grande colaboração e revisão deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Dr. Álvaro de Baptista Neto, pela grande ajuda nas partes experimentais, Juliana pela ajuda e paciência em ensinar, Sheila, Luciana Brites, Luciana Futiwaki, Kamilla, Vanessa, Isara, Patrícia, Fernando Góes e Clóvis.

Aos meus amigos de graduação que ainda persistem em ficar no Departamento de Engenharia Química, Marina, Antônio Carlos, Michael e Fernando Góes.

Ao técnico mecânico Oscar e ao técnico de laboratório Amadeus pela ajuda cedida e sempre simpatia.

Aos meus amigos que me agüentam, Augusto Carbol, Tiago Varussa, Rafael (Presunto), Gerson (Fozzy), Nabil, Roberta, Richard e todos os outros que não cabem aqui nesta folha.

A CNPQ pelo auxílio financeiro.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABELAS .....	VI
NOMENCLAUTURA .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Biorreatores .....	4
2.1.1. Biorreatores tipo tanque agitado e aerado .....	4
2.1.2. Biorreator tipo torre ou coluna de bolhas .....	5
2.1.3. Biorreator airlift .....	6
2.2. Emprego de Biorreator Airlift em Bioprocessos .....	10
2.3. Avaliação da Hidrodinâmica e da Transferência de Massa em Biorreatores Airlift .....	14
2.4. Transferência de Calor em Biorreatores Airlift.....	20
2.5. Antibióticos .....	22
2.6. Ácido clavulânico .....	25
2.7. <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	28
2.8. Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	30
2.9. Demanda e Transferência de Oxigênio em Bioprocessos .....	35
2.10. Consumo de potência em Biorreatores .....	39
2.10.1. Consumo de potência para o biorreator airlift .....	39



2.10.2. Consumo de potência em biorreatores convencionais .....	40
2.11. Reologia de caldos fermentativos .....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1. Biorreator airlift .....	45
3.2. Biorreator convencional .....	50
3.3. Avaliação da Transferência de calor em Biorreator airlift .....	51
3.4. Avaliação de Transferência de Oxigênio .....	55
3.4.1. Método Dinâmico considerando o Atraso da Resposta do Eletrodo .....	55
3.4.2. Método do Sulfito .....	59
3.5. Avaliação do arraste de água do sistema biorreator mais Condensador .....	61
3.6. Cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para a produção do ácido clavulânico .....	62
3.6.1. Microrganismo .....	62
3.6.2. Preservação do microrganismo e preparação de criotubos .....	63
3.6.3. Meios de Cultura .....	64
3.6.3.1. Meio de cultura de Reativação (MR) .....	64
3.6.3.2. Meio de cultura de Inóculo (MI) .....	64
3.6.3.3. Meio de cultura de Produção (MP) .....	65
3.6.4. Cultivo em Biorreatores para a produção de ácido clavulânico .....	65
3.6.4.1. Reativação .....	65
3.6.4.2. Etapa de Preparação do Inóculo .....	66
3.6.4.3. Cultivos em Batelada .....	66

3.6.4.4. Aspectos práticos na execução dos ensaios .....	68
3.6.5. Métodos Analíticos .....	68
3.6.5.1. Determinação da concentração de glicerol (Cs) .....	68
3.6.5.2. Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico (Cp) .....	69
3.6.5.3. Medidas Reológicas .....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.1. Determinação do coeficiente global de transferência de calor (U) ....	71
4.2. Avaliação do arraste de água do sistema biorreator mais condensador .....	76
4.3. Avaliação da transferência de oxigênio.....	80
4.4. Comparação entre consumos de potência de sistemas gaseificados por unidade de volume e transferência de oxigênio nos biorreatores airlift e convencional .....	85
4.5. Comparação entre o método dinâmico e o método do sulfito para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) .....	88
4.6. Cultivo de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para produção de ácido clavulânico .....	94
4.6.1. Cultivos em Biorreator tipo tanque agitado e aerado .....	94
4.6.2. Cultivos em Biorreator Airlift .....	98
4.6.3. Comparações entre cultivos em diferentes Biorreatores .....	101
4.6.4. Condições de cisalhamento empregadas nos cultivos .....	105
5. CONCLUSÕES .....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113

## RESUMO

A importância do biorreator airlift tem crescido no campo da biotecnologia por aspectos como a sua alta transferência de oxigênio, obtida através de consumo de potência.

No presente trabalho foram avaliadas as condições de transferência de calor e massa, bem como a eficiência do condensador na retenção de água, de um biorreator airlift de circulação interna, onde o ar é injetado pelo centro do tubo interno, de bancada de 6 L de capacidade útil. Tal biorreator é dotado de tubo interno ("draft tube") oco funcionando como um trocador de calor para controle de temperatura e de aspersor tipo cruzeta para aspersão de ar.

Valores do coeficiente global de transferência de calor ( $U$ ) foram determinados em diferentes condições de operação a partir de balanço de energia aplicado no sistema após o mesmo atingir o estado estacionário. Valores de  $U$  variaram na faixa de 300 a 700  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ , mostrando que o dispositivo de troca térmica proposto foi eficiente na remoção de calor. Os resultados foram correlacionados com a vazão de água no interior do tubo interno e com a vazão de alimentação de ar no biorreator.

Após esta etapa, avaliou-se o arraste de água do sistema biorreator mais condensador em diferentes condições de vazão de ar e de temperaturas no biorreator e no condensador. O condensador mostrou-se eficiente na retenção de água, obtendo valores de eficiência superiores a 80%, mas não solucionou por completo o problema de perda de água do sistema por arraste pelos altos fluxos de ar em que se opera o biorreator airlift. A variável vazão de ar foi a variável que influenciou mais significativamente o arraste de água.

A transferência de oxigênio foi avaliada através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ). Para efeito de comparação, valores de  $k_La$  foram obtidos no biorreator airlift operado numa faixa de vazão específica de alimentação de ar de 1 a 5 vvm e em biorreator convencional de 4 L, em diferentes condições de agitação (600, 800 e 1000 rpm) e aeração (0,5 e 1,0 vvm). Dois métodos para determinação do  $k_La$  foram empregados, o método do sulfito e o método dinâmico considerando o atraso da resposta do eletrodo. Este último que gerou resultados entre 2 e 6 vezes inferiores, dependendo do tipo do biorreator, pois avalia o  $k_La$  em meios coalescentes, similares à maioria dos caldos de fermentação.

Por fim, para validar a utilização do sistema como biorreator, foram realizados cultivos com *Streptomyces clavuligerus* visando à produção de ácido clavulânico, um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, enzimas produzidas por microrganismos patogênicos que clivam o anel dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Foram realizados quatro cultivos, dois em biorreator airlift e dois em biorreator convencional (Bioflo III) em duas diferentes condições de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) e os resultados foram comparados em termos de produção do ácido clavulânico.

As concentrações máximas de ácido clavulânico obtidas nos cultivos em biorreator airlift foram superiores àquelas obtidas em biorreator tipo tanque agitado e aerado, com menores índices de consistência ( $K$ ), mostrando maior cisalhamento nos biorreatores airlift nas mesmas condições de transferência de oxigênio.

Em termos globais, os resultados obtidos sugerem esse biorreator como o mais adequado para este tipo de cultivo, justificado pelas adequadas transferências de calor e massa aliadas ao menor consumo de energia.

## ABSTRACT

The importance of the airlift bioreactor has grown in the biotechnology field by aspects as high oxygen transfer, with power input low.

In this work were study the conditions heat and mass transfer, as well as the condenser efficiency in the water retention, of an airlift bench bioreactor of internal circulation of useful capacity 6 L. Such bioreactor is endowed with hollow draft tube working as a heat charger for temperature control and of aspensor type crosspiece for aspersion of air.

Values of the heat transfer global coefficient (U) were certain in different operation conditions starting from applied energy balance in the system after the same to reach the steady state. Values of U varied in the range from 300 to 700  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ , showing that the device of thermal change proposed was efficient to heat removal. The results were correlated with the water flow inside the draft tube and with the feeding air flow in the bioreactor.

After this stage, it was evaluated water drags of the bioreactor system plus condenser in different conditions of air flow and temperatures in the bioreactor and in the condenser. The condenser was shown efficient in the water retention, obtaining efficiency superior values to 80%, but it didn't solve the problem of water loss by water drag for the high air flows in that the airlift bioreactor is operated. The variable air flow was the variable that influenced more significantly water drags.

The transfer oxygen was evaluated through the oxygen transfer volumetric coefficient ( $k_La$ ). For comparison,  $k_La$  values were obtained in the airlift bioreactor operated in a range of specific feeding air flow from 1 to 5 vvm and in conventional bioreactor of 4 L, in different agitation conditions (600, 800 and 1000 rpm) and aeration (0,5 and 1,0 vvm). Two methods for  $k_La$  determination were employees, the sulfite method and the dynamic method considering the delay of the electrode answer. This last one that generated results between 2 and 6 times inferior, depending of bioreactor type, because it evaluates the  $k_La$  in coalescent media, similar to most of the media fermentation.

Finally, to validate the use of the system as bioreactor, cultivations with *Streptomyces clavuligerus* seeking to the production of clavulanic acid, a potent inhibitor of  $\beta$ -lactamase, enzyme produced by patogenics microorganism that broke  $\beta$ -lactamic rings of antibiotics. Four cultivations were accomplished, two in airlift bioreactor and two in bioreactor conventional (Bioflo III) in two different conditions of oxygen transfer ( $k_La$ ) and the results were compared in terms of clavulanic acid production.

The maximum clavulanic acid concentrations obtained in the cultivations in airlift bioreactor were superior those obtained in conventional bioreactor, with minors consistence index (K), showing larger shear rate in the airlift bioreactors in the same conditions of transfer oxygen.

In global terms, the obtained results suggest that bioreactor as the most appropriate for this cultivation type, justified for the appropriate heat and mass transfers formed an alliance with the smallest energy consumption.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado.....	5
Figura 2-2 Biorreator tipo coluna de bolhas.....	6
Figura 2-3 Biorreator airlift com circulação externa.....	8
Figura 2-4 Biorreator airlift de circulação interna.....	8
Figura 2-5 Regimes de circulação em biorreatores Airlift.....	19
Figura 2-6 - Fórmula estrutural de penicilinas e cefalosporinas.....	24
Figura 2-7 Fórmula estrutural da molécula de ácido clavulânico.....	25
Figura 2-8 Participação do glicerol e ornitina na biossíntese do ácido clavulânico.....	28
Figura 2-9 Imagens típicas de <i>Streptomyces clavuligerus</i> (Pinto, 2002).....	29
Figura 2-10 - Caminho percorrido pelas moléculas de oxigênio em processos aeróbios (Bailey e Ollis, 1986).....	38
Figura 3-1 Biorreator airlift e esquema da circulação do fluido.....	49
Figura 3-2 Desenho esquemático com cotas e detalhe do aspensor.....	50
Figura 3-3 Esquema para determinação experimental do coeficiente global de transferência de calor.....	52
Figura 3-4 Diagrama do balanço de energia do biorreator airlift.....	53
Figura 3-5 Representação esquemática da concentração do oxigênio em função do tempo para a definição da constante de atraso do eletrodo....	57
Figura 4-1 Gráfico do U calculado em função de U experimental.....	76
Figura 4-2 Gráfico do arraste calculado versus arraste experimental.....	79

Figura 4-3 Exemplo do ajuste do modelo para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.....	81
Figura 4-4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio $k_{La}$ em função da vazão de ar.....	83
Figura 4-5 Gráfico do consumo de potência específica de sistema gaseificados em função do $k_{La}$ .....	87
Figura 4-6 Esquema ilustrativo de soluções coalescentes e não-coalescentes.....	89
Figura 4-7 Valores de $k_{La}$ para o biorreator airlift em função da vazão de ar obtidos pelo método dinâmico e de sulfito.....	91
Figura 4-8 Valores de $k_{La}$ para o biorreator convencional em função da vazão de ar obtidos pelo método dinâmico e de sulfito.....	93
Figura 4-9 Resultados do cultivo B1 em biorreator tipo tanque agitado e aerado a 600 rpm e 0,5 vvm.....	95
Figura 4-10 Resultados do cultivo B2 em biorreator tipo tanque agitado e aerado a 800 rpm e 0,5 vvm.....	96
Figura 4-11 Comparação entre os cultivos B1 e B2 , concentração de ácido clavulânico ( $C_{ac}$ ) e oxigênio dissolvido (%), índice de escoamento (K).....	97
Figura 4-12 Resultados do cultivo A1 em biorreator Airlift com aeração de 3 vvm.....	98
Figura 4-13 Resultados do cultivo A2 em biorreator Airlift com aeração de 4,08 vvm.....	99

Figura 4-14 Comparação entre os cultivos A1 e A2, concentração de ácido clavulânico (Cac) oxigênio dissolvido (%) e índice de consistência (K).....	100
Figura 4-15 Comparação dos cultivos A1 e B1, com a produção de ácido clavulânico (Cac), índice de consistência (K) e oxigênio dissolvido (OD).....	102
Figura 4-16 Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cac), índice de consistência (K) e concentração de OD para os cultivos A2 e B2.....	103
Figura 4-17 Valores de produção de ácido clavulânico para os cultivos A1, B1, B2 e A2.....	105
Figura 4-18 Gráfico do índice de consistência máxima em função da velocidade de cisalhamento.....	108
Figura 4-19 Gráfico de produção de ácido clavulânico máximo em função da velocidade de cisalhamento.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 – Valores aproximados dos coeficientes globais de transferência de calor (U) para algumas situações físicas.....	22
Tabela 3-1 - Características dos cultivos realizados em biorreator airlift e convencional.....	67
Tabela 4-1 - Valores do coeficiente global de troca térmica (U) em diferentes condições de operação.....	72
Tabela 4-2 - Dados experimentais da avaliação do arraste de água do biorreator airlift.....	77
Tabela 4-3 - Valores do $k_{La}$ para biorreator airlift para vazões específicas de ar de 1 a 5 vvm.....	82
Tabela 4-4 - Valores de $k_{La}$ para biorreator convencional em diferentes condições de agitação e aeração.....	84
Tabela 4-5 - Condições de aeração no biorreator airlift que definem os mesmos valores de $k_{La}$ encontrados no biorreator convencional	85
Tabela 4-6 – Potências transferidas por unidade de volume e $k_{La}$ em diferentes condições de operação área para os biorreatores airlift e convencional.....	86
Tabela 4-7 - Resultados de $k_{La}$ para o biorreator airlift pelo método dinâmico e do sulfito.....	90
Tabela 4-8 - Resultados de $k_{La}$ para o biorreator convencional pelo método dinâmico e do sulfito.....	92
Tabela 4-9 - Condições de $k_{La}$ para os cultivos B1, B2, A1 e A2.....	94



Tabela 4-10 – Valores de nos diferentes tipos de biorreatores nas condições de cultivo empregadas.....	107
--	-----

## NOMENCLATURA

$\dot{V}_{ar}$  : vazão de alimentação de ar ( $m^3.s^{-1}$ ).

$\dot{Q}$  : calor transferido por unidade de tempo do tubo interno oco para o interior do biorreator airlift (W);

$\tau_e$  : tempo de resposta do eletrodo (s)

$\tau$  : tensão de cisalhamento (Pa).

$\phi_{TI}$  : vazão específica de água no interior do tubo interno ( $s^{-1}$ )

$\phi_{resf}$  : vazão específica de água para resfriamento ( $s^{-1}$ )

$\phi_{ar}$  : vazão específica de ar ( $s^{-1}$ )

$\dot{\gamma}$  : velocidade de cisalhamento ou gradiente de velocidade ( $s^{-1}$ ).

$A_D$  : área superficial da região de descida de líquido ( $m^2$ )

$A_S$  : área superficial da região de subida de líquido ( $m^2$ ).

C: concentração real de oxigênio dissolvido ( $mmol.L^{-1}$ )

$C_e$ : concentração de oxigênio dissolvido lido pelo eletrodo ou sinal do eletrodo. ( $mmol.L^{-1}$ )

$C_{O_2^*}$ : concentração de saturação do oxigênio ou a concentração de equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa ( $mmol.L^{-1}$ ).

$C_{O_2}$ : concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida ( $mmol.L^{-1}$ ).

$C_x$  : concentração celular ( $g.L^{-1}$ )

$C_s$ : concentração de substrato (glicerol) ( $mg.L^{-1}$ )

$D_i$  : diâmetro do impelidor (m)

$D_i$ : diâmetro do impelidor (m)

$D_t$ : diâmetro do tanque (m)

$f_c$ : fator de correção (-)

$g$ : aceleração da gravidade ( $m.s^{-2}$ )

$H_e$  = constante de Henry ( $1,557.10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}.\text{mmHg}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ );

$H_L$ : altura de líquido (m)

$K$ : índice de consistência ( $\text{Pa.s}^n$ ).

$k_e$ : constante de atraso do eletrodo ( $s^{-1}$ )

$k_{L,a}$ : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ ).

$M$ : massa molecular do gás ( $g.mol^{-1}$ )

$n$ : índice de comportamento de escoamento (adimensional).

$n$ : número de moles de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (mols)

$N$ : frequência de rotação ( $s^{-1}$ )

$N_{O_2}$ : velocidade de transferência de oxigênio ( $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

$N_P$ : Número de potência (-)

$P_C$ : potência relativa a energia cinética (W)

$P^e$ : pressão na entrada do sistema (absoluta) ( $\text{N.m}^{-2}$ )

$P_G$ : potência total (W)

$P_I$ : potência relativa a expansão isotérmica (W)

$P_O$ : consumo de potência para o sistema não gaseificado (W)

$P^s$ : pressão na saída do sistema (absoluta) ( $\text{N.m}^{-2}$ )

$P_T$ : pressão total do sistema (absoluta).

$Q$ : vazão volumétrica de alimentação de gás ( $\text{m}^3.s^{-1}$ )

$Q_{GS}$ : vazão volumétrica de alimentação de gás

$Q_{LD}$ : vazão volumétrica de líquido na região de descida

$Q_{LS}$ : vazão volumétrica de líquido na região de subida

$Q_{O_2}$ : velocidade específica de respiração celular

$Re$ : número de Reynolds (-)

$T_1$ : Temperatura de água na entrada do tubo interno ( $^{\circ}C$ )

$T_2$ : Temperatura de água na saída do tubo interno ( $^{\circ}C$ )

$T_3$ : Temperatura de ar na entrada do reator ( $^{\circ}C$ )

$T_4$ : Temperatura de ar na saída do reator ( $^{\circ}C$ )

$T_5$ : Temperatura de água na entrada de resfriamento do reator ( $^{\circ}C$ )

$T_6$ : Temperatura de água na saída de resfriamento do reator ( $^{\circ}C$ )

$t_c$ : tempo de circulação (s)

$T_{cond}$ : Temperatura do condensador ( $^{\circ}C$ );

$t_m$ : tempo de mistura (s)

$T_{Meio}$ : Temperatura do biorreator ( $^{\circ}C$ )

$U$ : coeficiente global de transferência de calor ( $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ );

$U_{GS}$ : velocidade superficial do gás na região de subida ( $m.s^{-1}$ )

$U_{LD}$ : velocidade superficial do líquido na região de descida ( $m.s^{-1}$ )

$U_{LS}$ : velocidade superficial do líquido na região de subida ( $m.s^{-1}$ )

$V$ : volume do reator ( $m^3$ )

$v_{LD}$ : velocidade linear de líquido na região de descida

$v_{LS}$ : velocidade linear de líquido na região de subida

$Y_{O_2}^e$ : fração molar de oxigênio no gás de entrada;

$\Delta t$ : tempo decorrido (s)

$\Delta T_m$ : média logarítmica da diferença de temperatura ( $^{\circ}C$ );

$\varepsilon$  : retenção gasosa

$\varepsilon_D$  : retenção gasosa na região de descida

$\varepsilon_G$  : retenção gasosa na região global

$\varepsilon_S$  : retenção gasosa na região de subida

$\mu$  : viscosidade do fluido ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

$\rho$  : densidade do fluido ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

$\rho_G$  : densidade do gás ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

# 1 INTRODUÇÃO

Biorreatores são equipamentos utilizados para converter matérias primas em produtos utilizando-se microrganismos, células animais ou vegetais ou enzimas. Dentre os diversos tipos de biorreatores, os mais amplamente em processos fermentativos, são os convencionais, tipo tanque agitado e aerado e os não convencionais pneumáticos tipo coluna de bolhas e tipo airlift (Schügerl, 1987).

Biorreatores pneumáticos têm se tornado interessantes na biotecnologia, frente ao convencional tipo tanque agitado e aerado, por conta de sua relativamente alta velocidade de transferência de oxigênio aliada a um consumo de energia menor.

Biorreatores com circulação gerada a partir de gaseificação são denominados de airlift. Estes têm características intermediárias entre o tipo coluna de bolhas e o tipo tanque agitado e aerado. São aplicados com êxito em processos com necessidades de transferências de calor e massa eficientes como cultivos envolvendo microrganismos aeróbios que geram caldos de fermentação não-Newtonianos viscosos.

No laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar (LEB-DEQ/UFSCar), o primeiro modelo de biorreator airlift de circulação interna do laboratório foi proposto por Gouveia *et al.* (2003). Tal sistema de 6 L de capacidade útil continha um aspersor tipo anel perfurado com injeção de ar na região anular. Na seqüência, Cassiano Filho (2003) avaliou a transferência de oxigênio

nesse mesmo sistema com diferentes diâmetros de tubo interno, tipo e diâmetro de aspersores e orifícios, utilizando o método modificado do sulfito de sódio para obtenção do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), que gerou resultados de  $k_{La}$  inferiores quando comparados aqueles obtidos em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado (Bioflo III) com o mesmo método de medida.

Ainda, o sistema utilizado por Cassiano Filho (2003) apresentou como dispositivo de troca térmica, um encamisamento externo com serpentina de mangueira de silicone, pouco eficaz para controlar a temperatura do caldo de fermentação durante o processo de produção de ácido clavulânico, um inibidor de enzimas  $\beta$ -lactamases que hidrolizam o anel  $\beta$ -lactâmicos de penicilinas tornando-as inativas.

Com base nos trabalhos realizados e nos resultados encontrados até o momento relacionados com o desempenho do biorreator airlift projetado e construído no DEQ/UFSCar; na busca de se efetuar melhorias adicionais em termos transferências de calor e massa, e de operação no mesmo visando seu uso de forma eficiente em cultivos de longa duração envolvendo microrganismos filamentosos aeróbios, o presente trabalho apresentou os seguintes objetivos:

- avaliação da transferência de calor do sistema via determinação do coeficiente global de transferência de calor ( $U$ ) em função das vazões de ar de alimentação e de água, utilizando um tubo interno oco construído em aço inox, como dispositivo de troca térmica.

- avaliação do arraste de água do sistema em diferentes condições de aeração e determinação da eficiência do condensador, para posterior utilização em cultivos de longa duração.

- avaliação da transferência de oxigênio no biorreator airlift utilizando o método de medida dinâmico para o coeficiente volumétrico de transferência do oxigênio ( $k_{L,a}$ ) considerando o atraso do eletrodo e comparação dos resultados com aqueles obtidos em biorreator convencional de bancada (Bioflo III).

- comparação entre valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) obtidos pelos métodos do sulfito e dinâmico para os biorreatores convencionais e airlift.

- validação do sistema como um biorreator eficiente, para aplicação em cultivos descontínuos para produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* comparando seu desempenho em produção de AC com resultados obtidos no biorreator convencional de bancada (Bioflo III) em diferentes condições de agitação e aeração que definiram diferentes valores de  $k_{L,a}$ .



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biorreatores**

Biorreatores são todos os equipamentos utilizados para converter matérias-primas em produtos utilizando-se microrganismos, células animais ou vegetais ou enzimas. Microrganismos e células estão constantemente envolvidos num ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento. Um biorreator mantém este processo natural provendo condições adequadas como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios), possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos (Schügerl, 1987). Embora existam diversos modelos de biorreatores, os mais comumente empregados em cultivos de microrganismos e células, independentemente da escala são os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e os não convencionais pneumáticos, tipos “coluna de bolhas” ou “torre” e “airlift”.

#### **2.1.1 Biorreatores tipo tanque agitado e aerado**

Esse tipo de biorreator é conhecido como fermentador convencional. A agitação é realizada por meio de impelidores conectados a um eixo giratório e aerado pela parte inferior do biorreator.

O fermentador tipo tanque agitado é o tipo mais importante biorreator para processos industriais. A agitação do biorreator tipo tanque

agitado tem várias funções, como as transferências de quantidade de movimento, calor e massa, e homogeneização das suspensões. A otimização de tarefas específicas para o biorreator convencional resultou em diferentes tipos de impelidores, sendo mais utilizado impelidor tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton, com o aspensor de gás abaixo do impelidor (Asenjo e Merchuk, 1994).

A Figura 2.1 apresenta as características de um típico biorreator convencional.

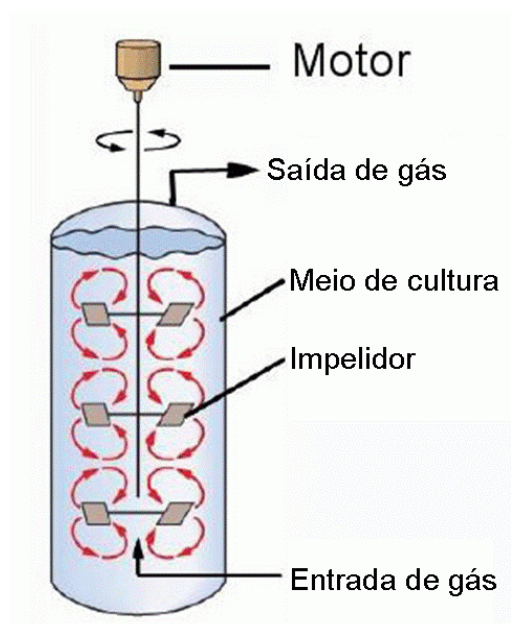


Figura 2-1 Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado

### 2.1.2 Biorreator tipo torre ou coluna de bolhas

Esse tipo de biorreator é classificado como não convencional, ou também pneumático, apresenta uma constituição muito simples. A homogeneização do meio, bem como a aeração é realizada via borbulhamento de ar no fundo do frasco.

A Figura 2.2 apresenta as características de um típico biorreator tipo coluna de bolhas.

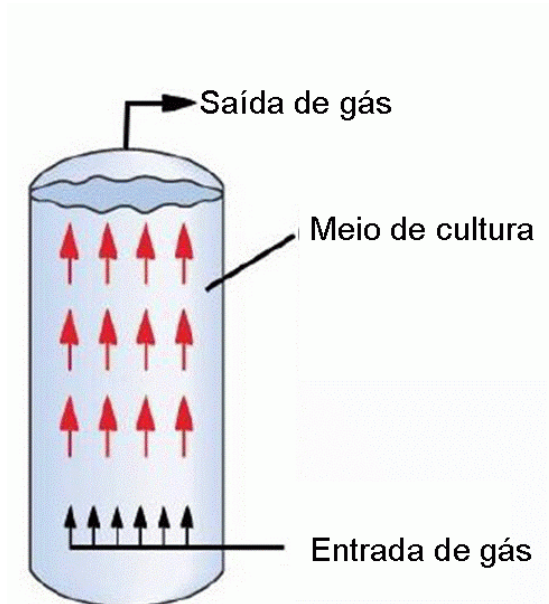


Figura 2-2 Biorreator tipo coluna de bolhas

### 2.1.3 Biorreator airlift

Fermentador airlift é um tipo especial de biorreator para fermentação aeróbia. Para este sistema é importante promover a transferência de massa aumentando a área interfacial (Onken, *et al.*1983).

O equipamento clássico para difusão do gás na fase líquida, especialmente em fermentação aeróbia é o tipo tanque agitado e aerado, na qual o ar é difundido por agitação mecânica. Porém esse tipo de fermentador apresenta uma série de desvantagens, especialmente em processos de grande escala, alto gasto de energia, alta complexidade de construção e dificuldades no aumento de escala. (Onken, *et al.*1983).

Estas desvantagens são superadas pelo biorreator airlift, pois não apresenta partes móveis, na qual a difusão gás-líquido é pela entrada de ar por aspersor pneumáticamente (Onken, *et al.*1983).

A primeira aplicação dos princípios do airlift em fermentação foi em Scholler-IG vat, na Alemanha na década de 50 para a produção de levedura.

O meio de cultura nesse tipo de biorreator é movido de baixo para cima dentro de um tubo situado verticalmente no interior do frasco pelas bolhas de ar produzidas no fundo do frasco de cultivo. Esse modelo apresenta bons resultados, uma vez que há uma boa aeração e homogeneização do meio de cultura e pouco dano mecânico ao material em cultivo (Park *et al*, 1989).

Duas classes básicas de biorreatores “airlift” podem ser distinguidas (Chisti, 1989a):

- “Airlift” com circulação interna – trata-se de uma única coluna dividida em duas regiões internas de circulação. Estas regiões são denominadas de subida (“riser”) e de descida (“downcomer”) apresentadas na Figura 2-3.

- “Airlift” com circulação externa – as regiões de subida e de descida de líquido ocupam dois tubos conectados por seções horizontais próximas ao topo e a base da coluna do biorreator, apresentada na Figura 2-4.

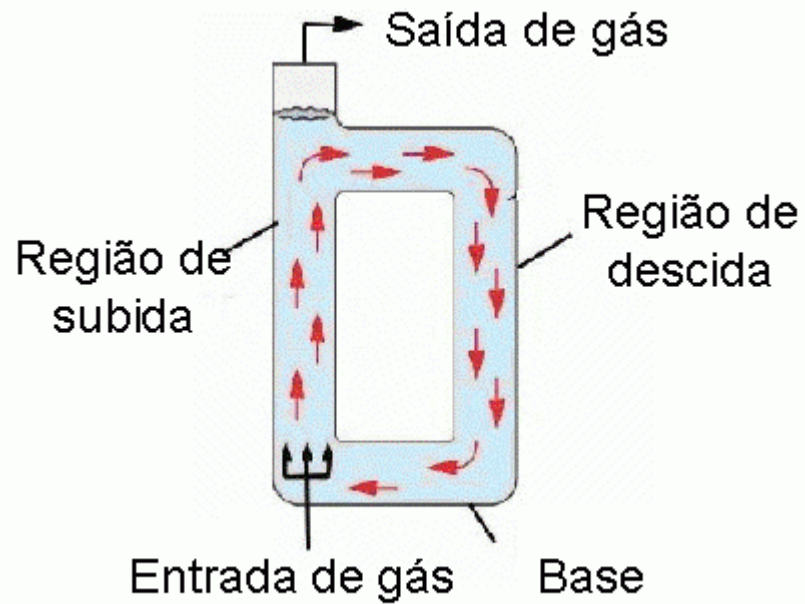


Figura 2-3 Biorreator airlift com circulação externa

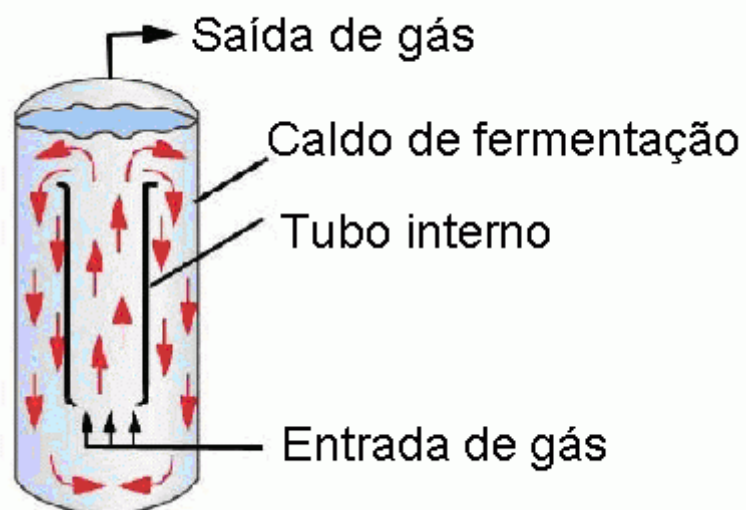


Figura 2-4 Biorreator airlift de circulação interna

Os “loop reactors” com circulação interna onde a mistura e a circulação de líquido são induzidos pela injeção e movimentação de um gás, mais conhecidos como biorreatores tipo airlift de circulação interna, apresentam um tubo concêntrico (“tubo interno”). O movimento ascendente do gás aspergido na base do reator “carrega” a fase líquida e as células que compõem o caldo de fermentação, pelo interior do tubo interno ou pelo espaço anular, dependendo da localização do aspersor (normalmente do tipo anel de vários orifícios). No topo (cabeça) do reator, o gás se desprende do líquido e o líquido degaseificado desce pelo interior do espaço anular ou do tubo interno, distinta da região por onde ascendeu. Na base do biorreator, o fluido descendente encontra a corrente ascendente de gás, uma região de baixa pressão, sendo novamente carregado ascendentemente por esta, o que confere ao meio reacional uma circulação interna contínua.

Os biorreatores “airlift” podem ser empregados em cultivos como caldos mais viscosos, ao contrário dos biorreatores tipo torre ou coluna de bolhas, além de não apresentar grandes problemas com relação a coalescência de bolhas. No entanto, a transferência de massa entre os elementos de fluido é menor que a observada nos biorreatores convencionais e, dependendo da escala, o período transiente de circulação desde a base até o topo e novamente do topo até a base pode ser importante (Chisti, 1989b).

Os biorreatores pneumáticos tipo airlift têm atraído atenção no campo da biotecnologia por aspectos como a sua alta transferência de

oxigênio, obtida através de um relativo baixo consumo de potência e baixas tensões de cisalhamento (Chisti, 1989b).

Principalmente por proporcionar condições de baixo cisalhamento os biorreatores “airlift” com circulação interna têm sido a melhor escolha em processos nos quais a tensão de cisalhamento é o fator determinante do bom desempenho do mesmo (Chisti, 1989b).

## **2.2 Emprego de Biorreator Airlift em Bioprocessos**

Nos últimos anos os biorreatores airlift vêm sendo cada vez mais empregados em bioprocessos que antes utilizavam com maior frequência os biorreatores convencionais. Na seqüência são apresentados trabalhos relevantes relacionados com o uso de biorreatores airlift em processos fermentativos.

Ichi *et al.* (1993) desenvolveram um biorreator airlift com circulação interna em escala comercial, para aplicação no cultivo de levedura *Candida utilis* visando a extração de RNA. A velocidade de transferência de oxigênio e a produtividade em células neste biorreator foram muitos superiores que as alcançadas em um biorreator convencional tipo tanque agitado aerado.

Gavrilescu e Roman (1998) pesquisaram a produção de três antibióticos em dois biorreatores “airlift” com circulação externa e um com circulação interna, comparando as suas eficiências com as de biorreatores tipo agitado e aerado. Os antibióticos Bacitrin e Cefalosporina C foram produzidos respectivamente por *Bacillus lichenniformis* e

*Cephalosporium acremonium* cultivados em biorreator “airlift” com circulação externa, e Nistatina foi produzida por *Streptomyces noursei*, cultivada em um sistema de circulação interna.

Como resultado geral, a eficiência da transferência de oxigênio (velocidade de transferência de O<sub>2</sub> em relação à potência aplicada) nos biorreatores “airlift” foi cerca de 38% maior que a encontrada para biorreatores convencionais, a razão entre a velocidade de transferência de oxigênio em relação da produção de antibiótico foi 22% maior no sistema airlift. Além do mais, a utilização do “airlift” proporcionou um aumento entre 30 – 40% na eficiência e economia de energia comparada com o biorreator convencional.

Yuguo *et al.* (1999) pesquisaram a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em um biorreator airlift de circulação externa de 8,5 L de volume. Obtiveram uma concentração de ácido cítrico de 10,6 g.L<sup>-1</sup> com 65 horas de cultivo a uma vazão de ar de 1,3 vvm, sendo que em biorreator de tanque agitado e aerado obtiveram uma concentração de ácido cítrico de 9,6 g.L<sup>-1</sup> com 200 rpm de frequência de agitação e vazão de ar de 1 vvm. Isto demonstra que o biorreator airlift de circulação externa pode ser utilizado para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

Jia *et al.* (1999) estudaram o efeito do óleo de soja sobre a transferência de oxigênio na produção de tetraciclina por *Streptomyces auroefaciens* CG-1 utilizando biorreator airlift. Os resultados mostraram que o óleo de soja além de ser uma fonte de carbono viável é também um



agente que diminui a tensão superficial na bolha de ar aumentando a transferência de oxigênio.

Aleksieva e Peeva (2000) estudaram a biossíntese de protease ácida, uma enzima hidrolítica com aplicabilidade na indústria de alimentos, através do cultivo de *Humicola lutea* 120-5 em um biorreator “airlift” de circulação interna com tubo concêntrico nos modos batelada e contínuo, e compararam os resultados de produção com aqueles obtidos em um biorreator convencional. No modo batelada, o desempenho dos dois reatores foi similar, com as concentrações de células alcançando valores máximo entre 11 e 12 g de massa seca. L<sup>-1</sup>. As atividades proteolíticas máximas estiveram entre 1100 e 1200 U.mL<sup>-1</sup>, pH que foi iniciado em 5,8 alcançou o valor entre 3,0 e 3,5 e permaneceu praticamente constante até o final da batelada. Houve diferenças significativas no comportamento do crescimento de *H. lutea*. No biorreator tipo tanque agitado e aerado o fungo cresceu na forma filamentosa. Já no airlift a falta de dos aparatos mecânicos gerou um ambiente favorável para os microrganismos, levando o *H. lutea* a crescer na forma de “pellets” bem compactados. Após 60 h, a forma de operação contínua foi acionada. Os valores de concentração de células estiveram entre 10 e 12 g massa seca.L<sup>-1</sup>, glicose residual, entre 4,0 e 6,0 g.L<sup>-1</sup> e atividade enzimática entre 800 e 1000 U.mL<sup>-1</sup>. O regime permanente foi alcançado após 40 h do início do modo contínuo. A taxa de diluição ótima empregada foi de 0,05 h<sup>-1</sup>. O processo foi operado por 14 dias com a máxima atividade específica de 90 U. mg<sup>-1</sup> de massa seca de micélios e

resultou em  $38 \text{ U.mg}^{-1}$  de glicose consumida. A produtividade volumétrica ( $50 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi aproximadamente três vezes superior que a obtida no modo batelada. A flutuação da atividade proteolítica (entre 800 e  $1100 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foi atribuída a um escoamento inconstante de caldo. Estes resultados indicaram que a produção de protease ácida no biorreator airlift foi comparável à alcançada no biorreator tipo tanque agitado. A maior atividade proteolítica ( $2000 \text{ U.mL}^{-1}$ ) obtida no biorreator convencional foi, provavelmente, devido à liberação da enzima no meio, causada pelo rompimento das hifas (cisalhamento). O uso do biorreator airlift pode contribuir para uma redução de custo do processo, pois o consumo de potência deste está entre 17 a 64% menor que o de um biorreator convencional, dependendo das vazões de aeração, que acarretam em uma importante economia de energia.

Domingues *et al.* (2001) utilizaram um biorreator airlift de 5,5 L com circulação interna, de tubo concêntrico aerado na região do tubo interno (0,08 a  $1,00 \text{ vvm}$ ) em cultivo contínuo ( $D=0,1$  a  $0,55 \text{ h}^{-1}$ ) de leveduras floculantes geneticamente modificadas para a produção de etanol a partir de soro de queijo. O objetivo foi o de programar um processo de tratamento alternativo do soro, subproduto da indústria de laticínios, produzido em grande quantidade e altamente poluente. Ao final, produziu-se o álcool com consumo total de lactose presente no soro. Com isso, obteve-se um produto com valor econômico além de solucionar o problema ambiental.

Sánchez *et al.* (2002) estudaram a reologia do caldo de cultivo de *Beta vulgaris* utilizando biorreator airlift de 10 L. Culturas de células vegetais são consideradas uma alternativa para produção de metabólitos secundários. *Beta vulgaris* produz pigmentos solúveis em água, utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica. O biorreator airlift aerado com vazão de ar de (0,2 vvm), atingindo um valor de  $k_{La}$  de  $19 \text{ h}^{-1}$ . O caldo apresentou características não-Newtonianas que gerou problemas de mistura do caldo e dispersão do gás, obtendo uma produção de pigmento menor que a relatada em reatores convencionais agitados e aerados.

Gouveia *et al.* (2003) caracterizou a hidrodinâmica e a transferência de oxigênio em um biorreator airlift com circulação interna, de tubo concêntrico, com aeração no espaço anular utilizando-se anel perfurado, a partir de variações na geometria e vazão de alimentação do ar. A importante conclusão deste trabalho é que coeficiente de transferência de massa é afetado por pequenas mudanças nas relações geométricas.

### **2.3 Avaliação da Hidrodinâmica e da Transferência de Massa em Biorreatores Airlift**

Na seqüência encontra-se uma breve descrição dos parâmetros mais relevantes envolvidos no projeto e no desempenho de biorreatores airlift (Chisti 1989):

- Velocidade superficial do gás: a velocidade superficial do gás na região de subida ( $U_{GS}$ ) é, na verdade, a única variável de operação

disponível no sistema “Airlift”. Trata-se da razão entre a vazão volumétrica de alimentação do gás ( $Q_{GS}$ ) e da área da seção transversal da região de subida ( $A_S$ ).

$$U_{GS} = \frac{Q_{GS}}{A_S} \quad \text{Eq. 2-1}$$

- Retenção gasosa: define-se como retenção gasosa a fração de volume da fase gasosa na mistura gás-líquido presente no biorreator, podendo este ser dividido em retenção gasosa global ( $\varepsilon_G$ ), retenção gasosa na região de subida ( $\varepsilon_S$ ) e retenção gasosa na região de descida ( $\varepsilon_D$ ) (Chisti, 1989).

$$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_G + V_L} = \frac{A_S \cdot \varepsilon_S + A_D \cdot \varepsilon_D}{A_S + A_D} \quad \text{Eq. 2-2}$$

Dado que a fase líquida circula continuamente pelo biorreator, definem-se as vazões volumétricas nas regiões de subida ( $Q_{LS}$ ) e de descida ( $Q_{LD}$ ).

$$Q_{LS} = U_{LS} \cdot A_S \quad \text{Eq. 2-3}$$

$$Q_{LD} = U_{LD} \cdot A_D \quad \text{Eq. 2-4}$$

Pela equação de continuidade:

$$Q_{LS} = Q_{LD} \quad \Rightarrow \quad U_{LS} \cdot A_S = U_{LD} \cdot A_D \quad \text{Eq. 2-5}$$

$$v_{LS} \cdot A_S \cdot (1 - \varepsilon_S) = v_{LD} \cdot A_D \cdot (1 - \varepsilon_D) \quad \text{Eq. 2-6}$$

onde  $v_{LS}$  e  $v_{LD}$  são velocidades lineares de líquido nas regiões de

subida e descida, respectivamente. Rearranjando a equação anterior tem-se que:

$$\varepsilon_D = \frac{v_{LS} \cdot A_S}{v_{LD} \cdot A_D} \cdot \varepsilon_S - \left( \frac{v_{LS} \cdot A_S}{v_{LD} \cdot A_D} - 1 \right) \quad \text{Eq. 2-7}$$

$$\varepsilon_D = \alpha \cdot \varepsilon_S - \beta \quad \text{Eq. 2-8}$$

$$\alpha = \frac{v_{LS} \cdot A_S}{v_{LD} \cdot A_D} \quad \beta = \alpha - 1 \quad \text{Eq. 2-9}$$

Obs: através da relação acima, nota-se que é impossível a condição de  $\alpha=1$ . Quando  $\varepsilon_D=0$ , não há recirculação de gás pela região de descida, logo, esta será a situação que terá que ser ultrapassada para se iniciar a circulação no reator. Nesta situação, calcula-se o  $\varepsilon_S$  crítico (Chisti, 1989):

$$\varepsilon_{S \text{ CRÍTICO}} = 1 - \frac{v_{LD} \cdot A_D}{v_{LS} \cdot A_S} \quad \text{Eq. 2-10}$$

- Velocidade Superficial do Líquido: A velocidade de circulação do líquido ( $U_{CL}$ ) é gerada a partir da diferença das retenções gasosas das regiões de subida e de descida, mas as variáveis que têm um valor significativo de tratamento do fenômeno são as velocidades superficiais do líquido na região de subida e descida,  $U_{LS}$  e  $U_{LD}$ , respectivamente (Gavrilescu e Tudose, 1998b).

- Velocidade linear do líquido: As velocidades lineares do líquido nas regiões de subida e descida,  $v_{LS}$  e  $v_{LD}$ , respectivamente, são as

velocidades superficiais do líquido nas respectivas regiões, subtraindo-se a parcela referente ao gás, como já disposto anteriormente.

- Tempo de Mistura: É definido como o tempo necessário para que uma substância se misture igualmente no biorreator. O tempo de mistura ( $t_m$ ) é muito difícil de ser correlacionado devido a sua alta sensibilidade em relação ao local onde o traçador é injetado para a sua detecção (Chisti, 1989a). A sua detecção é dada através de um ensaio tipo pulso. Quando o valor da variável estudada se estabiliza o tempo de mistura é determinado.

- Tempo de Circulação: O tempo de circulação ( $t_c$ ) é diferente do tempo de mistura ( $t_m$ ). Trata-se do tempo necessário para apenas uma volta por todo biorreator. Esta variável também é medida através de ensaio tipo pulso, sendo determinada apenas na primeira volta.

- Transferência de oxigênio: o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) é um parâmetro de extrema importância a ser avaliado em biorreatores em geral, já que no caso dos cultivos aeróbios o principal objetivo é garantir uma transferência de oxigênio adequada para suprir a demanda do processo.

Os parâmetros definidos anteriormente para biorreatores “airlift” são diretamente afetados pelas características geométricas do sistema que inclui a relação entre as áreas de subida e descida, distâncias entre a base do reator e o limite inferior do tubo interno, entre outras. Ainda, deve-se salientar que diferentes tipos de aspersores podem ser empregados no projeto e construção desses biorreatores, afetando diretamente o

desempenho desses equipamentos.

Os tipos de aspersores mais difundidos no projeto de um biorreator “airlift” são do tipo tubo perfurado ou placa porosa. Em condições de operação com alta turbulência, amplamente utilizada, o tamanho da bolha na dispersão torna-se independente do seu tamanho na origem. No biorreator de coluna de bolhas a posição do aspersor oferece poucas opções, já no caso do “airlift” não há essa limitação. O fluxo de líquido sobre e ao redor do aspersor afetam a distribuição do gás. Segundo Chisti (1989a), este assunto tem sido negligenciado na literatura existente.

Fields *et al.* (1983) estudaram a dispersão de traçador em biorreatores airlift de tubos concêntricos operados com a mistura ar-água, utilizando três diferentes comprimentos de tubo interno, verificando a diferença de tempo médio de circulação. Verificaram também a mistura com a presença ou não de aditivos diminuiu o tamanho das bolhas.

Chisti *et al.* (1986) pesquisaram a transferência de oxigênio e hidrodinâmica em biorreatores tipo coluna de bolha e airlift. Trabalharam com três fases, utilizando fibras celulósicas como sólido. A hidrodinâmica e a transferência de oxigênio foram discutidas para diferentes configurações de biorreatores. Os autores mostraram que coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ) e retenção gasosa ( $\epsilon$ ) correlacionaram-se satisfatoriamente com a velocidade superficial de gás na região de subida ( $U_{sg}$ ) de acordo com a equação tipo que segue:

$$k_L a = a \cdot U_s g^b$$

$$\varepsilon = c \cdot U_s g^d$$
Eq. 2-11

Onde  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  são parâmetros dependentes da geometria do biorreator, das propriedades físicas dos fluidos e do regime de escoamento. A presença de sólidos resultou em um decréscimo acima de 80 % no  $k_{LA}$  e retenção gasosa comparado com soluções sem sólidos.

Heijnen *et al.* (1997) determinaram três regimes de circulação em biorreator airlift de circulação interna, baseados em medidas e em observação visual da presença da fase gasosa na região de descida. A Figura 2-5 ilustra os regimes de circulação.

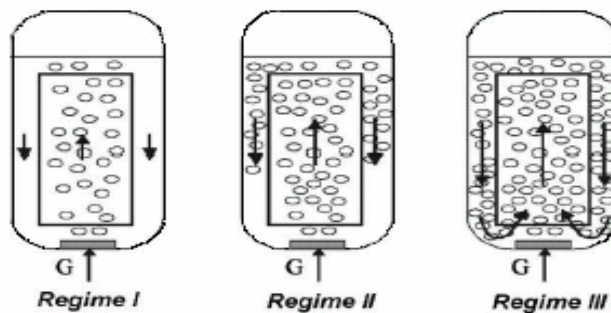


Figura 2-5 Regimes de circulação em biorreatores Airlift

Regime I: *o gás não está presente na região de descida.* Este regime ocorre somente em baixas vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ), quando a velocidade de circulação do líquido não é suficiente para induzir bolhas para a região de descida.

Regime II: *estratificação e estagnação das bolhas na região de descida.* Com valores maiores para a vazão específica de alimentação de ar, a velocidade do líquido na região de descida torna-se praticamente



igual à velocidade de subida do aglomerado de bolhas. Logo, uma distribuição axial do tamanho das bolhas é observada. A transição deste regime para o seguinte é mais gradual. Portanto, às vezes é mais difícil determinar o ponto exato de transição para o regime III, onde há a completa recirculação do gás.

Regime III: *recirculação de bolhas*. Em altos valores de vazão de alimentação de ar, a velocidade do líquido na região de descida é suficientemente alta para a recirculação das bolhas que são arrastadas do separador (região de mistura) para a região de descida.

## **2.4 Transferência de Calor em Biorreatores Airlift**

Nos processos fermentativos, devido à existência de reações bioquímicas no interior das células, há liberação de calor para caldo de cultivo. Uma vez que as células desenvolvem suas atividades metabólicas em condições ótimas de temperatura, faz-se necessário à retirada contínua de calor do meio reacional, o que é realizada através da passagem de fluido de resfriamento (água) no interior de dispositivos de troca térmica como camisa d'água e serpentinas. No projeto de biorreatores, portanto, deve-se levar em conta a transferência de calor no sistema, que pode ser avaliada em diferentes condições de operação, a partir da determinação dos coeficientes de transferência de calor. Como é difícil quantificar os coeficientes convectivos individuais de transferência de calor nas regiões interna e externa do dispositivo de troca térmica, a determinação do coeficiente global de transferência de calor (U) pode ser

utilizada nesta avaliação. Deve-se lembrar que  $U$  engloba os coeficientes convectivos individuais internos e externos e a espessura e condutividade térmica do material de construção (vidro ou aço inoxidável). Normalmente, dada a alta vazão de fluido de resfriamento dentro do dispositivo de troca térmica e alta condutividade térmica dos materiais de construção aliada à pequena espessura da parede de separação, a maior parte da resistência deve-se à película estagnada no interior do caldo de fermentação e, portanto,  $U$  apresenta valores próximos de  $h_{\text{Caldo}}$ .

Existem poucas informações na literatura, relacionadas à determinação e valores do coeficiente global de transferência de calor ( $U$ ) em biorreatores. Alguns trabalhos informam valores ou faixas do coeficiente convectivo da película de caldo e outros propõem correlações para estimar esse parâmetro em função das propriedades físicas do fluido, da geometria do biorreator e das condições de operação (Chisti, 1989). MacAdams (1954) *apud* Doran (1995) cita que o coeficiente individual de transferência de calor para aquecimento ou resfriamento de água encontra-se na faixa de 300 a 17.000  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$ . Quanto a informações relacionadas a caldos de cultivo, Chakravart (1971) *apud* Chisti (1989) informam que  $h_{\text{Caldo}}$  varia entre 600 e 2.400  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$  enquanto que Blakebrough *et al.* (1983) *apud* Chisti (1989) obtiveram valores de até 8.000  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$  para caldos de cultivos de *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*.

Holman (1983) apresenta valores aproximados dos coeficientes globais de transferência de calor em diferentes situações. Tabela 2.1 que

segue apresenta a tabela com os valores de U.

Tabela 2-1 – Valores aproximados dos coeficientes globais de transferência de calor (U) para algumas situações físicas.

Valores aproximados dos Coeficientes Globais de Transferência de Calor (U)	
Situação Física	$W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$
Condensador de Vapor	1100 – 5600
Aquecedor de água de alimentação	1100 – 8500
Condensador de R-12 resfriado com água	280 - 850
Trocador de Calor Água – Água	850 – 1700
Trocador de calor de tubo aletado com água no interior dos tubos e ar sobre os tubos	25 – 55
Trocador Água – Óleo	110 – 350
Vapor – Óleo Combustível leve	170 – 340
Vapor – Óleo Combustível pesado	56 – 170
Vapor – Querosene ou Gasolina	280 – 1140
Trocador de calor de tubo aletado com vapor nos tubos e ar sobre os tubos	28 – 280
Condensador de Amônia, água nos tubos	850 – 1400
Condensador de Álcool, água nos tubos	255 – 680
Trocador de Calor Gás – Gás	10-40

Num trabalho mais recente, Prakash *et al.* (2001) estudaram a determinação local do coeficiente de transferência de calor em biorreator tipo coluna de bolhas de bancada durante o cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*. O coeficiente de transferência local de calor foi relacionado com a velocidade superficial do gás. Os valores encontrados ficaram na faixa de 1000 a 8000  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ , para velocidade superficial de gás variando de 0 a 0,30  $m.s^{-1}$ .

## 2.5 Antibióticos

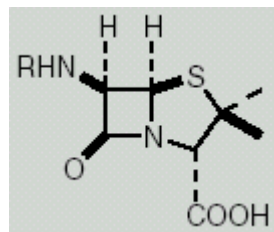
Em 1928, enquanto estudava variantes de estafilococos no laboratório do St. Mary's Hospital, em Londres, Alexander Fleming observou que um fungo que contaminava uma das culturas, causava morte das bactérias em sua vizinhança. O meio em que o fungo se

desenvolvia era acentuadamente inibidor para muitos microrganismos. Como esse fungo pertencia ao gênero *Penicillium*, Fleming deu o nome de penicilina à substância antibacteriana. Uma década mais tarde, a penicilina tornou-se um agente terapêutico sistêmico graças às brilhantes pesquisas de um grupo de pesquisadores na Universidade de Oxford, dirigidas por Florey, Chain e Abraham. (<http://www.infomed.hpg2.ig.com.br/penicilinas.html>).

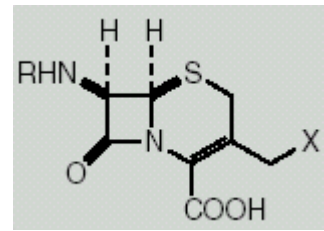
Os antibióticos são definidos como agentes antimicrobianos sintetizados por microrganismos ou plantas que provocam a morte ou inibem o crescimento de outros microrganismos, mesmo em pequenas concentrações.

Dentre os antibióticos de maior destaque, podem ser citadas as penicilinas e as cefalosporinas naturais produzidas industrialmente por via fermentativa a partir de linhagens dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*. Esses antibióticos, denominados  $\beta$ -lactâmicos por apresentarem na sua estrutura molecular um anel do mesmo nome, vêm sendo utilizados como matérias primas na produção via síntese química de antibióticos semi-sintéticos (Vandamme, 1984).

A Figura 6 que segue, ilustra as estruturas das penicilinas e cefalosporinas.



Penicilinas



Cefalosporinas

Figura 2-6 - Fórmula estrutural de penicilinas e cefalosporinas

As bactérias possuem uma parede celular que envolve totalmente a membrana citoplasmática. Tal parede mantém a forma e protege tais microrganismos de alta pressão osmótica interna. Em bactérias Gram-negativas, a porção externa da parede celular consiste de uma dupla camada lipídica (membrana externa). A parede celular contém um complexo polimérico de ligação cruzada quimicamente distinto, os peptidoglicanos. Ele é constituído de cadeias de glicano que consistem de bandas lineares e resíduos piraminosídicos alternados de dois amino açúcares (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico), que apresentam ligação cruzada com peptídeos. A composição dessa ligação peptídica cruzada é típica de cada microrganismo e confere a rigidez final da parede celular. A camada de peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas é de 50 a 100 moléculas enquanto que a das Gram-negativas possui apenas uma ou duas.

As penicilinas são inibidoras seletivas da síntese da parede celular bacteriana, embora seja apenas uma das ações desses fármacos, é melhor compreendido que as demais

## 2.6 Ácido clavulânico

Ácido z - (2R,5R) - 3 - (β-hidroxiethylideno) - 7 - oxo - 4 - oxa - 1 - azabicyclo [3,2,0] heptano-2-carboxílico é o nome oficial do ácido clavulânico. Apresentam em sua estrutura dois anéis: o anel β-lactâmico e o anel oxalidino (Howart, 1976 *apud* Britto, 1998) como apresentado na Figura 2-3. Possui baixa atividade antimicrobiana, necessitando de altas concentrações para manifestá-la, porém o interesse comercial por este produto centra-se na sua utilização como inibidor de β-lactamases, administrado em conjunto com outros antibióticos, potencializando a ação destes no combate a bactérias resistentes. A Figura 2.7 apresenta a estrutura molecular deste composto.

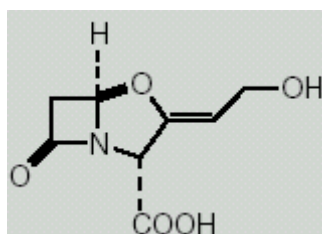


Figura 2-7 Fórmula estrutural da molécula de ácido clavulânico.

As combinações de amoxicilina-ácido clavulânico, ticarcilina-ácido clavulânico e ampicilina-ácido clavulânico têm se mostrado comprovadamente efetivas no tratamento clínico de várias infecções como as do trato respiratório, urinário, pele, tecidos e outros. Existem, no entanto, situações restritivas ao seu uso devido a alguns efeitos colaterais causados por estas combinações (Gresser, 2001).

Segundo Brown (1981), o ácido clavulânico possui efeito sinérgico

aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apenas quando é utilizado no combate a microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamases. No combate a microrganismos não produtores de  $\beta$ -lactamases, mas sensíveis aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, não são observadas melhoras no desempenho dos antibióticos. Em estudo realizado com bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, o autor mostra que a concentração de amoxicilina necessária para combater as infecções em presença de ácido clavulânico é 100 vezes menor do que quando este antibiótico foi utilizado isoladamente.

O ácido clavulânico é um inibidor de  $\beta$ -lactamase, enzima produzida por algumas bactérias, responsável pela clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas o que resulta na perda da atividade antibacteriana e conseqüente ineficácia desses antibióticos no combate a infecções causadas por bactérias patogênicas.

Ácido clavulânico é apenas um modesto antibiótico, efetivo contra infecções bacterianas em humanos, mas um potente inibidor e inativador das enzimas  $\beta$ -lactamases que confere às bactérias resistência contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Haginaka *et al.* (1981) investigaram a estabilidade do ácido clavulânico em soluções aquosas onde o pH variou de 3,2 a 10 a 35 °C e revelaram que a degradação em soluções alcalinas é dez vezes mais rápida que a degradação em meio ácido, sendo que a máxima estabilidade foi com o pH 6,4.

Bersanetti *et al.* (2000) também estudaram a velocidade de hidrólise do ácido clavulânico em diferentes valores de pH, entre 2,5 a 10°C, a 20 °C, recolhendo-se amostras periodicamente para a determinação da concentração de ácido clavulânico. Os autores observaram que a faixa de maior estabilidade ficou entre valores de pH de 5 a 7.

O ácido clavulânico é encontrado em medicamentos na forma de sais de metais alcalinos, clavulanato de potássio, em conjunto com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a amoxicilina (Baptista-Neto, 2000).

A biossíntese do ácido clavulânico é considerada mais complexa que as relatadas das penicilinas e cefalosporinas (Towsend, 2002).

Chen *et al.* (2003) pesquisaram a influência do glicerol, da arginina e ornitina na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada e em batelada alimentada. Os autores mostraram que a ornitina e arginina tiveram efeito positivo na biossíntese do ácido clavulânico, mas obteve-se melhor resultado com a alimentação de ornitina do que de arginina, sendo a ornitina um melhor estimulador para a produção de ácido clavulânico. A função do glicerol também foi pesquisada neste trabalho e concluiu-se que o mesmo tem função muito importante na produção de ácido clavulânico, sendo o precursor na formação da estrutura C<sub>3</sub> desse composto, como ilustrado na Figura 8, e que a ornitina é o precursor na formação da estrutura C<sub>5</sub> do ácido clavulânico. Este estudo, com alimentação intermitente de glicerol e ornitina, resultou em um acréscimo de 270% (311 mg.L<sup>-1</sup>) na



concentração de ácido clavulânico.

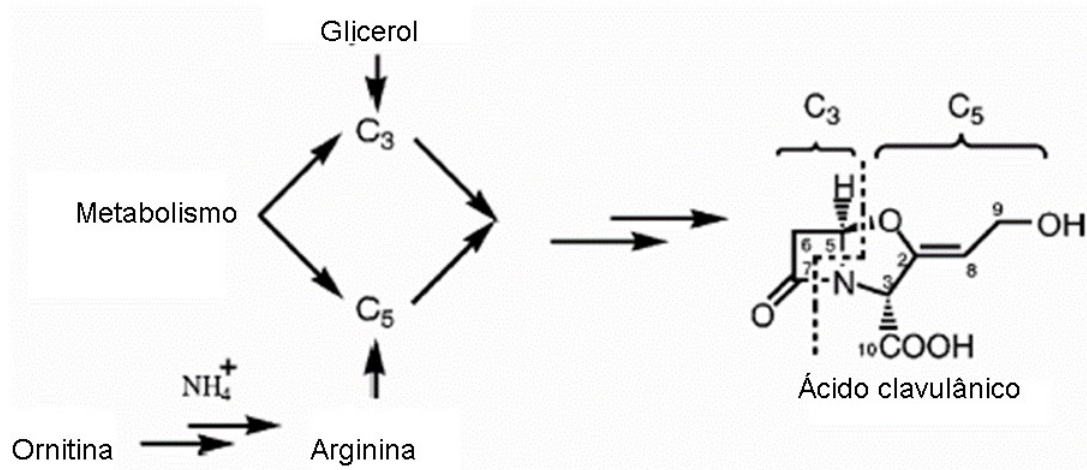


Figura 2-8 - Participação do glicerol e ornitina na biossíntese do ácido clavulânico

## 2.7 *Streptomyces clavuligerus*

A grande maioria dos produtos terapêuticos utilizados no combate às doenças infecciosas causadas por bactérias é sintetizada através do metabolismo secundário de microrganismos isolados do solo, como fungos e bactérias filamentosas, entre as quais incluem as do gênero *Streptomyces*.

*Streptomyces* sp são actinomicetos que, em cultivo submerso, produzem hifas vegetativas (micélios) que não se fragmentam com facilidade. São microrganismos gram-positivos, aeróbios, primariamente habitantes do solo e semelhantes aos fungos (Pinto, 2002). Na Figura 2-9 ilustra imagens típicas de *Streptomyces clavuligerus*

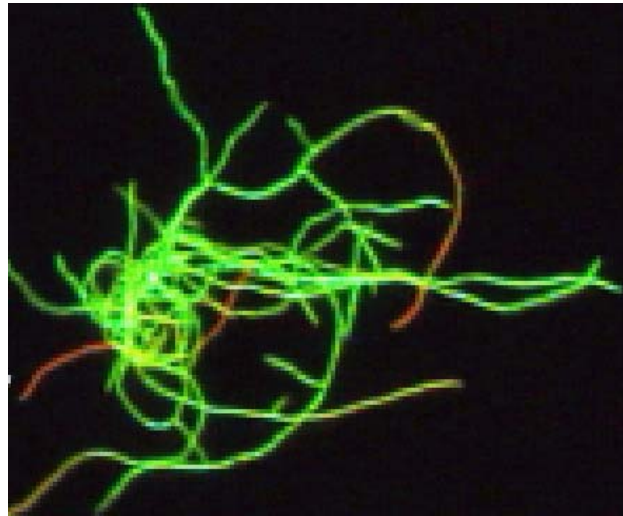


Figura 2-9 Imagens típicas de *Streptomyces clavuligerus* (Pinto, 2002).

Existem várias espécies de *Streptomyces*, bactéria filamentosa estritamente aeróbia, que produzem ácido clavulânico entre as quais: *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces jumonjenensis* e *Streptomyces kasurahamanus* (Butterwoth, 1984).

*Streptomyces clavuligerus* é uma das espécies produtora de ácido clavulânico, além de outros compostos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina N, a desacetoxicefalosporina C e a cefamicina C. Por se tratar de uma bactéria estritamente aeróbia e filamentosa, o cultivo de *Streptomyces clavuligerus* apresenta elevada a demanda de  $O_2$  e, simultaneamente, gera caldos com alta viscosidade aparente, o que acaba por dificultar a transferência de  $O_2$  da fase gasosa para a fase líquida, reduzindo a concentração de  $O_2$  dissolvido, o que pode limitar o crescimento bacteriano e a própria biossíntese do produto de interesse.

## **2.8 Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***

Alguns trabalhos sobre a regulação e otimização da síntese do ácido clavulânico têm sido reportados (Lebrihi *et al.*, 1987), no entanto, poucas informações acerca do processo de produção industrial deste composto apresentam-se disponíveis na literatura. Trabalhos publicados orientam que a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, produtora de ácido clavulânico deva ser preservada na forma de suspensão de esporos, numa faixa de temperaturas de -50°C a -18°C, em solução crioprotetora (glicerol 20% v/v) (Lebrihi *et al.*, 1987).

Quanto à composição do meio de cultura, Butterworth (1984) indica a proteína de soja como nutriente mais importante na biossíntese do ácido clavulânico. Desta forma, a maioria dos meios de cultura relatados são complexos, contendo farinha de soja como principal fonte de nitrogênio, associada a glicerol ou amido como fontes de carbono e energia.

Os meios sintéticos utilizados por Romero *et al.* (1984), que apresentam como constituintes básicos glicerol, sacarose e prolina (GSP) além de precursores, proporcionaram bons rendimentos tanto células quanto em produtos (ácido clavulânico e cefamicina C) e apresentam-se como uma boa alternativa para a utilização em cultivos com *Streptomyces clavuligerus*.

Higgins e Kastner (1971) estudaram quanto aos prováveis

constituintes a serem adicionados no meio de cultura, deve ser lembrado que, embora a glicose seja uma das fontes de carbono e energia mais amplamente utilizadas para o crescimento celular devido a sua fácil assimilação pela maioria dos microrganismos, esta não é metabolizada pelo *Streptomyces clavuligerus*.

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a influência do tipo da fonte principal de nitrogênio na biossíntese do ácido clavulânico, em biorreator tipo tanque agitado (10 litros) operado em batelada alimentada, com suplementação de glicerol. Utilizando farinha e extrato de farinha de soja, os autores constataram a superioridade da primeira. Quando utilizado o extrato de farinha de soja, o crescimento celular e a produção de ácido clavulânico ocorreram simultaneamente, sendo que durante a etapa de suplementação a concentração de produto manteve-se constante ou, em alguns casos, decresceu. Em contrapartida, a utilização de farinha de soja gerou uma velocidade de crescimento celular três vezes maiores na fase inicial, sem a formação de produto, a qual ocorreu apenas na etapa de suplementação, sem que fosse observada a decomposição do ácido clavulânico.

Lee e Ho (1996) utilizaram diferentes óleos como principais fontes de carbono para o crescimento e produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Foi observado que o óleo de dendê foi a melhor fonte de carbono para a produção do ácido clavulânico, enquanto que as utilizações tanto de ácido palmítico quanto de esteárico resultaram em baixa produção e, quando utilizada a sacarose nenhuma produção foi

observada. Também demonstraram que a bactéria *Streptomyces clavuligerus* não sintetiza ácido clavulânico na presença de sacarose, sendo observada produção apenas quando utilizados glicerol ou óleos vegetais como fonte de carbono.

Na mesma linha, Lebrihi *et al.* (1987) investigaram o fenômeno da repressão por fosfato na biossíntese de cefamicina C e ácido clavulânico e observaram que na presença de  $K_2HPO_4$  à concentração de 2mM, as atividades específicas das enzimas cefamicina-sintetase e ácido clavulânico-sintetase foram superiores, quando comparadas às atividades das mesmas em presença de  $K_2HPO_4$  à concentração de 75mM.

Quanto às condições de agitação empregadas em cultivos com *Streptomyces clavuligerus*, com conseqüentes influências na morfologia do microrganismo e na produtividade de ácido clavulânico, Belmar-Beiny e Thomas (1991), trabalhando em biorreator tipo tanque agitado (5 litros), operado em diferentes freqüências de rotação (490, 990 e 1300 rpm), observaram uma crescente fragmentação do micélio com o aumento da freqüência de rotação. No entanto, foram obtidas concentrações similares, tanto de massa celular quanto de ácido clavulânico, nas diferentes condições de agitação empregadas, indicando que nessas condições a morfologia do microrganismo não afetou as cinéticas de crescimento e de síntese do produto.

Quanto à influência do oxigênio, a literatura reporta que a produção de antibióticos por *Streptomyces clavuligerus* está diretamente relacionada com os níveis de concentração de oxigênio dissolvido no

meio de cultivo.

Trabalhando no processo de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em fermentador de 10 litros, Rollins *et al.* (1988b) observaram que a produção do metabólito secundário é influenciada pelo histórico do cultivo. Durante a fase de crescimento celular (trofofase) em cultivos em batelada, a concentração de oxigênio dissolvido caiu a níveis próximos de zero, retardando o aparecimento e diminuindo a produção final de cefamicina C. O controle da concentração de oxigênio dissolvido em 50 e 100% do valor de saturação não alterou significativamente a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) durante a trofofase, mas elevou a produção final do antibiótico em 2 a 3 vezes. Os resultados demonstraram que o controle da concentração de oxigênio dissolvido durante a trofofase melhora nitidamente a eficiência e a duração da biossíntese de cefamicina C. Quando a biossíntese do antibiótico e o crescimento celular ocorrem simultaneamente, dado que ambos os processos requerem oxigênio, a demanda pode proporcionar quedas severas na concentração de oxigênio dissolvido e afetar negativamente a produção de cefamicina C.

Yegneswaran *et al.* (1988) constataram a influência da porcentagem de oxigênio no gás de alimentação na produção de antibióticos por *Streptomyces clavuligerus* durante cultivos em batelada em fermentador de 50 litros utilizando-se meio definido (sintético). Os cultivos foram realizados à frequência de rotação de 300 rpm e vazão específica de ar de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto)

diferenciando-se na composição em oxigênio do gás de alimentação. Foram realizados dois cultivos utilizando-se ar (21% em O<sub>2</sub>) e uma mistura de ar com nitrogênio (14% em O<sub>2</sub>), respectivamente. Foi observado que a produção de antibióticos não foi afetada pela condição reduzida de oxigênio (14% em O<sub>2</sub>) nas primeiras 50 horas de fermentação. No entanto, após o crescimento cessar, ou seja, ao final da trofofase, a concentração de antibióticos permaneceu constante quando foi utilizado ar como gás de aeração e caiu à cerca de 1/3 do valor anterior quando foi utilizada a mistura com menor teor de O<sub>2</sub>. Segundo os autores, esses resultados sugerem que as biossínteses das enzimas responsáveis tanto pela produção quanto pela hidrólise dos antibióticos, podem ser reguladas pelas condições de aeração.

Gouveia (2001) investigou a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585 visando o desenvolvimento do processo de produção. Estudou a melhor fonte de nitrogênio em meio de cultura contendo glicerol como principal fonte de carbono e energia. Um extrato protéico de soja, comercializado como Samprosoy 90 NB (Bunge Alimentos S.A.) proporcionou melhores resultados.

Cassiano Filho (2003) pesquisou o emprego de biorreator airlift para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, comparando a produção com aquela em biorreator convencional, e após avaliação da capacidade da transferência de oxigênio pelo método do sulfito modificado. Foram realizados cultivos em diferentes condições de transferência de oxigênio. A produção de ácido clavulânico foi similar

àquela obtida em biorreator convencional, o que aliado com as condições de menores tensões de cisalhamento e consumo de potência atestam a sua utilização em bioprocessos. Diferente do esperado, os cultivos em biorreatores airlift não promoveram condições de limitação por falta de oxigênio, tal como previam os resultados obtidos a partir do método do sulfito modificado.

Rosa *et al.* (2005) estudaram os efeitos das condições de cisalhamento e da concentração de oxigênio dissolvido sobre a produção de ácido clavulânico forma estudados através de cultivos descontínuos em biorreator de bancada em diferentes frequências de rotação e vazão fixa de ar, um cultivo com controle da concentração de OD em 50% do valor de saturação com ar e um cultivo em que a concentração de OD foi mantida em valores superiores a 30% do valor de saturação com ar e a frequência de rotação foi fixada em 800 rpm. Foram verificadas alterações na quantidade e velocidade de produção de ácido clavulânico, bem como crescimento do microrganismo e fatores relacionados com a demanda de O<sub>2</sub>. A produção de ácido clavulânico foi fortemente influenciada pela condição de cisalhamento imposta através de diferentes frequências de rotação utilizadas, aliada a altas concentrações de O<sub>2</sub> dissolvido.

## **2.9 Demanda e Transferência de Oxigênio em Bioprocessos**

A concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura tem grande influência em bioprocessos que envolvem microrganismos



aeróbios (Shuler e Kargi, 1992).

Um problema peculiar relacionado ao oxigênio em bioprocessos é a sua baixa solubilidade quando comparado a outros nutrientes presentes em um meio fermentativo, associado em alguns casos, à grande demanda provocada por altas velocidades globais de respiração celular (Bailey e Ollis, 1986).

Além da baixa solubilidade do oxigênio, 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, devido ao aumento da concentração celular e o aumento da velocidade específica de respiração celular ( $Q_{O_2}$ ), o consumo de oxigênio é aumentado. Assim, em cultivos aeróbios descontínuos o consumo de oxigênio varia durante o processo (Rosa, 2002).

A concentração de oxigênio dissolvido no caldo de fermentação depende da velocidade específica de respiração do microrganismo ( $Q_{O_2}$ ) em conjunto com a concentração celular ( $C_x$ ), cujo produto  $Q_{O_2} \cdot C_x$  é a própria demanda de oxigênio do bioprocessos, além da transferência de oxigênio da bolha de ar para o caldo de fermentação.

Para atender a demanda de oxigênio, há a necessidade de uma transferência contínua de oxigênio para o caldo de fermentação. Para o equacionamento da transferência de massa, pode-se representar a velocidade de transferência de oxigênio ( $N_{O_2}$ ) do ar para o meio através da equação abaixo:

$$N_{O_2} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad \text{Eq. 2-12}$$

onde :

$N_{O_2}$ : velocidade de transferência de oxigênio ( $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

$k_L a$ : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{h}^{-1}$ ).

$C_{O_2}^*$ : concentração de saturação do oxigênio ou a concentração de equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ).

$C_{O_2}$ : concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ).

Para entender a demanda de oxigênio em bioprocessos com microrganismos aeróbios, a velocidade de transferência de oxigênio deve ser igual ou superior a velocidade global de respiração mantendo a concentração de oxigênio dissolvido constante e acima do seu valor crítico. A variação da concentração de oxigênio dissolvido em cultivos aeróbios em batelada, é dada pela equação:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = N_{O_2} - Q_{O_2} \cdot C_x \quad \text{Eq. 2-13}$$

O processo de transferência de oxigênio desde uma bolha de ar até a estrutura celular não é um processo simples. As várias etapas que interferem neste processo estão esquematizadas na Figura 2-10.

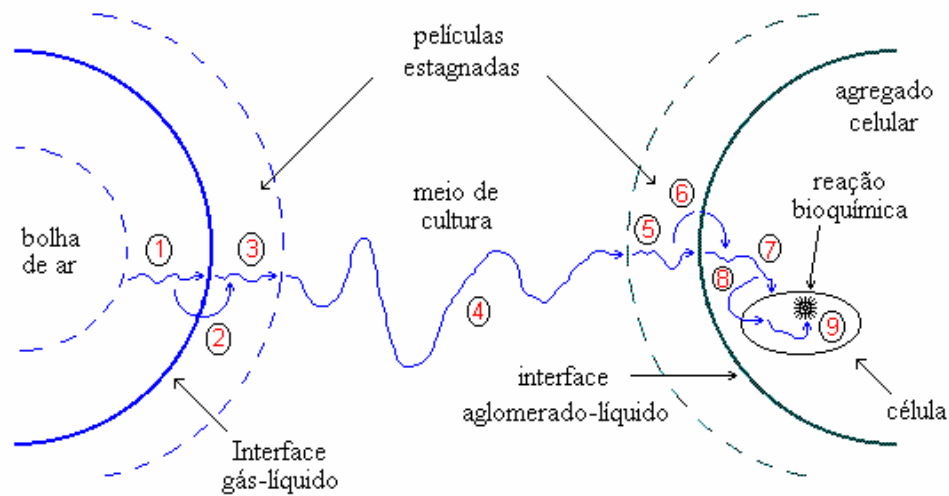


Figura 2-10 - Caminho percorrido pelas moléculas de oxigênio em processos aeróbios (Bailey e Ollis, 1986)

As resistências existentes estão relacionadas com as seguintes etapas:  $R_1$ : difusão através da película estagnada de gás;  $R_2$ : passagem através da interface;  $R_3$ : difusão através da película estagnada de líquido;  $R_4$ : transporte através do caldo;  $R_5$ : difusão através da película estagnada externa ao agregado celular;  $R_6$ : passagem pela interface caldo agregado celular;  $R_7$ : difusão através do agregado celular;  $R_8$ : passagem pela membrana celular;  $R_9$ : difusão no citoplasma.

A resistência global à transferência de massa é igual à soma das resistências e suas magnitudes dependem da hidrodinâmica da bolha e da fase líquida, composição e da reologia do caldo fermentativo, da concentração e da atividade celular, assim como de fenômenos interfaciais existentes e outros fatores (Bailey e Ollis, 1986).

## 2.10 Consumo de potência em Biorreatores

A potência transmitida ao fluido tem forte influência nos processos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa do processo sendo, portanto, um parâmetro de extrema importância no projeto, na operação e na ampliação de escala de fermentadores. Independentemente do modelo de biorreator, para transferir calor e massa de forma eficientes há, consumo de energia cujo montante depende das condições de agitação e ou aeração empregados.

### 2.10.1 Consumo de potência para o biorreator airlift

A potência transferidas ao fluido nas diferentes condições de aeração em biorreatores airlift pode ser quantificada a partir de equações propostas originalmente por Chisti (1989).

A potência total transferida ao fluido ( $P_G$ ) por unidade de volume ( $V$ ) se divide em duas parcelas; a primeira devida a expansão isotérmica do gás desde a aspensão até a superfície do fluido ( $P_I$ ) e a segunda devida à energia cinética das bolhas transferida ao fluido ( $P_C$ ). As equações que seguem expressam os respectivos consumo de potência.

$$\frac{P_I}{V} = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot R \cdot T}{V \cdot M} \cdot \ln\left(\frac{p^e}{p^s}\right) \quad \text{Eq. 2-14}$$

$$\frac{P_C}{V} = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot R \cdot T}{2 \cdot V} \quad \text{Eq. 2-15}$$

$$\frac{P_G}{V} = \frac{P_I}{V} + \frac{P_C}{V} \quad \text{Eq. 2-16}$$

onde:

$P_G$	potência total (W)
$P_I$	potência relativa a expansão isotérmica (W)
$P_C$	potência relativa a energia cinética (W)
$\rho_G$	densidade do gás ( $\text{kg.m}^{-3}$ )
$g$	aceleração da gravidade ( $\text{m.s}^{-2}$ )
$U_{GS}$	velocidade superficial do gás na região de subida ( $\text{m.s}^{-1}$ )
$p^e$	pressão na entrada do sistema (absoluta) ( $\text{N.m}^{-2}$ )
$p^s$	pressão na saída do sistema (absoluta) ( $\text{N.m}^{-2}$ )
$V$	volume do reator ( $\text{m}^3$ )
$M$	massa molecular do gás ( $\text{g.mol}^{-1}$ )

Segundo Chisti (1989), o cálculo da potência relativa à energia cinética pode ser desprezada, pois alcança no máximo 1,5 % do consumo de potência total.

### **2.10.2 Consumo de potência em biorreatores convencionais**

Nos fermentadores convencionais a energia é transmitida ao fluido, principalmente, através dos impelidores e, portanto, o consumo de potência durante a agitação deve-se, quase na sua totalidade à resistência que o caldo exerce sobre as pás dos impelidores quando esses são rotacionados (Badino, 1997).

O requerimento de potência em tanques agitados não gaseificados ( $P_O$ ) foi objeto de estudo de Rushton et al. (1950a, 1950b), que

desenvolveram o conceito de número de potência ( $N_P$ ). Os autores mediram as exigências de potência na agitação fluidos Newtonianos em tanques com e sem chicanas, utilizando diferentes impelidores e relacionaram os resultados experimentais baseando-se na relação entre os adimensionais de potência ( $N_P$ ) e número de Reynolds ( $Re$ ).

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D_i^2}{\mu} \quad \text{Eq. 2-17}$$

$$N_P = \frac{P_O}{\rho \cdot N \cdot D_i^5} \quad \text{Eq. 2-18}$$

onde:

$P_O$  consumo de potência para o sistema não gaseificado (W)

$N$  frequência de rotação ( $s^{-1}$ )

$D_i$  diâmetro do impelidor (m)

$\rho$  densidade do fluido ( $kg \cdot m^{-3}$ )

$\mu$  viscosidade do fluido ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ )

Para o impelidor tipo turbina de seis pás planas de uso muito comum em fermentadores convencionais, Rushton *et al.* (1950a, 1950b) encontraram o valor de 6,2 para  $N_P$  sob regime turbulento de agitação. Já Bates *et al.* (1963) e Treybal (1980) encontraram o valor de 5,0.

Um problema freqüente encontrado nas estimativas de consumo de potência é o fato de se ter um sistema com relações geométricas distintas daqueles do sistema a partir do qual os diagramas foram obtidos. Aiba *apud* Badino (1997) sugerem um fator de correção ( $f_c$ ) para multiplicar o valor do consumo de potência obtido de diagramas de literatura.

$$f_c = \sqrt{\frac{(D_t / D_i)^* (H_L / D_i)^*}{(D_t / D_i)(H_L / D_i)}} \quad \text{Eq. 2-19}$$

Onde o asterisco identifica as relações geométricas distintas do sistema padrão.

Michel; Miller *apud* Badino Jr. (1997) propuseram uma correlação para estimar o consumo de potência em sistemas gaseificados ( $P_G$ ), baseando-se em dados experimentais próprios e naqueles obtidos por Oyama; Endoh (1955). A correlação de grande poder de ajuste a dados experimentais é apresentada como segue:

$$P_G = 0,706 \cdot \left( \frac{P_0^2 \cdot N \cdot D_i^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45} \quad \text{Eq. 2-20}$$

onde:

Q: vazão volumétrica de alimentação de gás ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )

A constante 0,706 depende da geometria do sistema, e as unidades são a do sistema internacional (SI).

## **2.11 Reologia de caldos fermentativos**

A reologia estuda o mecanismo de escoamento de fluidos, estendendo-se para suspensões e mesclas e inclui fenômenos irreversíveis e deformações causadas pelo cisalhamento.

A grande maioria dos caldos de fermentações, sobretudo aqueles decorrentes de cultivos de microrganismos filamentosos, são reconhecidos como não Newtonianos. Grande parte ou quase a totalidade

desses caldos são caracterizados como fluidos pseudoplásticos que seguem o modelo da lei de potência descrito pela equação:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 2-21}$$

onde:

$\tau$  : tensão de cisalhamento (Pa).

$\dot{\gamma}$  : velocidade de cisalhamento ou gradiente de velocidade ( $s^{-1}$ ).

K : índice de consistência ( $Pa \cdot s^n$ ).

n : índice de comportamento de escoamento (adimensional).

Quando  $n < 1$ , o fluido é caracterizado como pseudoplástico. Soluções poliméricas de alto peso molecular e grande parte das suspensões, entre as quais se incluem caldos de fermentação com microrganismos filamentosos, são exemplos de fluidos pseudoplásticos [Roels *et al.* (1974) *apud* Badino Jr (1997)].

Quando  $n > 1$ , o fluido é denominado dilatante. Suspensões de amido, de silicato de potássio e de areia são exemplos de fluidos dilatantes. (Bennet e Myers 1978). Ao contrário dos fluidos pseudoplásticos, a viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) aumenta com a velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) para fluidos dilatantes.

Quando  $n = 1$ , o fluido é caracterizado como Newtoniano e, nesse caso, o índice de consistência (K) é a própria viscosidade do fluido.

Warren *et al.* (1995) *apud* Badino Jr. (1997) examinaram as reologias dos caldos e as morfologias de três actinomicetos em cultivos



submersos. Os caldos foram caracterizados como pseudoplásticos. Os índices de comportamento de escoamento ( $n$ ) mantiveram-se entre 0,20 e 0,25. Os índices de consistência ( $K$ ) aumentaram com a concentração celular ( $Cx$ ), apresentando um decréscimo no final do cultivo. Os comprimentos médios das hifas situaram-se na faixa de 15-25  $\mu\text{m}$ , não se alterando acentuadamente com as variações nos índices de consistências ( $K$ ).

Badino *et al.* (1999) descreveram os dados reológicos experimentais em termos do modelo da lei da potência, durante o cultivo de *Aspergillus awamori* para a produção de glicoamilase. O índice de consistência foi convenientemente relacionado com a concentração celular e com condições de cisalhamento representadas pela frequência de agitação ( $N$ ) e pela vazão de alimentação de ar ( $Q$ ).

$$K = 0,32 \cdot Cx^{3,29} \cdot N^{-4,33} \cdot Q^{-0,39} \quad \text{Eq. 2-22}$$

Os sinais dos expoentes indicaram que o aumento da frequência de agitação ( $N$ ) e da vazão de alimentação de ar ( $Q$ ) contribuíram para diminuir o índice de consistência ( $K$ ). Por outro lado, um aumento na concentração celular ( $Cx$ ) contribuiu para aumentar o parâmetro reológico.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 *Biorreator Airlift*

O biorreator airlift utilizado no presente trabalho tem seis litros de volume útil, que compreende cilindro externo confeccionado em material transparente (vidro) e base, tampos superior e inferior, cilindro interno, aspensor e condensador confeccionados em aço inoxidável. Os diversos itens que constituem o biorreator apresentam geometrias e relações entre diâmetros internos do cilindro interno ( $D_{i1}$ ) e externo ( $D_{e1}$ ), distâncias entre as extremidades do cilindro interno e a base do reator ( $H_1$ ) e o nível de meio reacional ( $H_2$ ) e tipo de aspensor de modo a obter um biorreator com dispositivos eficientes de transferências de calor e massa de ampla aplicação.

O biorreator airlift é descrito a seguir por referência à Figura 3-2.

O biorreator airlift compreende uma base sendo instalados sobre dita base: o cilindro externo transparente, o cilindro interno dotado de entrada de água e saída de água para o controle de temperatura, e aspensor de gás. A diferença de diâmetros dos cilindros e gera um espaço anular por onde circula o meio reacional

impulsionado pela quantidade de gás injetada pelo aspersor. O cilindro externo transparente é dotado de tampa inferior e superior. A tampa superior é dotada de um condensador para evitar perdas de água durante os processos. O sentido da movimentação do meio reacional está ilustrado na Figura 3-1.

O biorreator inclui um condensador, tipo casco e tubos, o que assegura uma eficiente retenção de água no sistema durante a operação.

Conforme comentado acima, o biorreator airlift apresenta sua aplicabilidade ampliada em parte da geometria de sua construção e das relações entre diâmetros internos de cilindros interno e externo ( $D_{i1}/D_{e1}$ ) e distâncias entre a extremidade do cilindro interno e a base do reator ( $H_1$ ) e entre a extremidade do cilindro interno e o nível do meio reacional ( $H_2$ ).

As distâncias e relações geométricas do sistema encontram-se nas seguintes faixas estabelecidas como segue:

$$H_1 = 4,1 \text{ cm}$$

$$D_{e2} = 19,0 \text{ cm}$$

$$H_2 = 4,1 \text{ cm}$$

$$D_{e1} = 13,6 \text{ cm}$$

$$H_3 = 32,9 \text{ cm}$$

$$D_{i1} = 8,0 \text{ cm}$$

$$H_4 = 41,1 \text{ cm}$$

$$D_{i2} = 9,0 \text{ cm}$$

$$H_5 = 60,0 \text{ cm}$$

$$0,1 H_4 = H_1 = H_2 \text{ e } D_{i1}/D_{e1} = 0,588$$

A Figura 3-2 anexa apresenta um desenho esquemático com um detalhe do aspensor em forma de cruzeta, dotado de perfurações para saída de gás, e o significado das dimensões H1 a H5,  $D_{i1}$ ,  $D_{i2}$  e  $D_{e1}$ . H4 é a distância da base até a altura do meio reacional, e H5 é a distância total entre as tampas e do biorreator. As perfurações do aspensor têm 0,5 mm de diâmetro e são espaçadas de 5 mm ao longo do comprimento das hastes do aspensor.

Concentração de oxigênio dissolvido (OD) e pH são medidos por sondas esterilizáveis instaladas em aberturas laterais, sendo acopladas a medidores/transmissores.

O meio reacional ou meio de cultura de fermentação é introduzido no biorreator pneumático através de bomba peristáltica. Após o término da reação ou do cultivo, o meio reacional ou caldo

de fermentação é retirado do biorreator através de abertura localizada na tampa inferior.

O fechamento do biorreator é como segue: o cilindro externo apresenta flanges nas duas extremidades. As tampas inferior e superior apresentam sulcos nas faces internas onde são encaixados anéis (“o-rings”) de silicone. Anéis de aço inoxidável são montados entre as flanges. Para fechamento das tampas, os anéis de silicone são encostados nas flanges e quatro parafusos recartilhados, rosqueados a mão para minimizar a tensão, são utilizados para unir os tampos com os anéis de aço inoxidável, prensando as flanges.

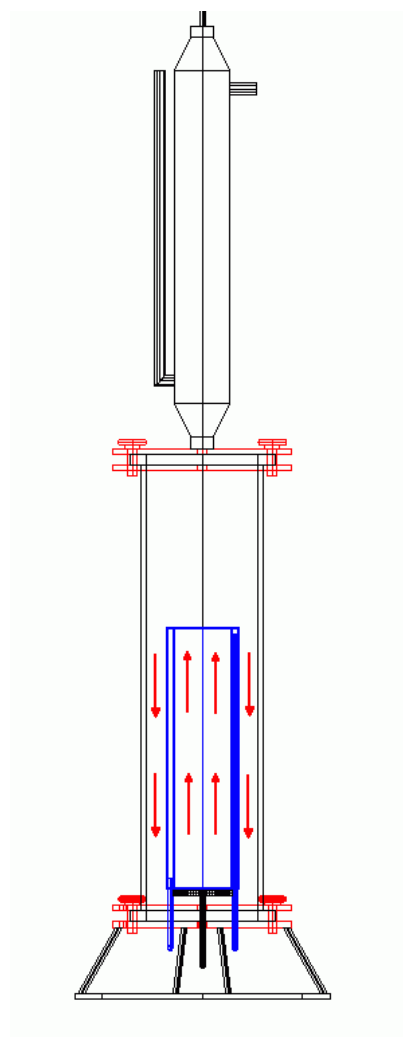


Figura 3-1 - Biorreator airlift e esquema da circulação do fluido

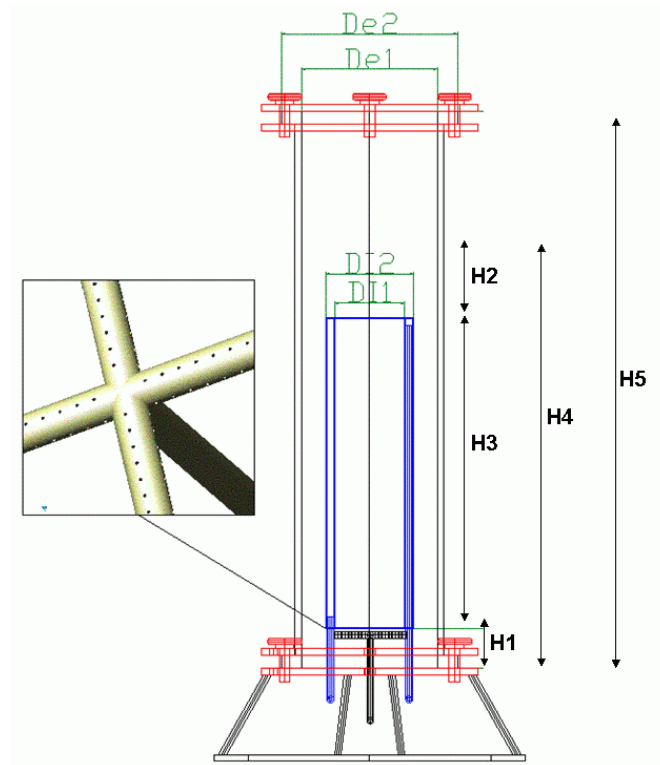


Figura 3-2 – Desenho esquemático com cotas e detalhe do aspersor

### 3.2 Biorreator Convencional

O biorreator convencional utilizado no presente estudo foi um New Brunswick Scientific Co. Inc (Bioflo III), tipo tanque agitado e aerado (Bioflo III), com volume útil de 4 L, diâmetro interno de 0,17 m, altura de líquido de 0,20 m, dotado de 4 aletas defletoras e com dois impelidores tipo turbina de seis pás planas de diâmetro 0,076 m.

### **3.3 Avaliação da Transferência de calor em Biorreator airlift**

A transferência de calor no biorreator airlift foi avaliada a partir da determinação do coeficiente global de transferência de calor (U) utilizando-se a metodologia proposta que segue, uma vez que não se encontrou nenhum estudo específico na literatura relacionando como a determinação do coeficiente global de transferência de calor em biorreatores tipo airlift. O aparato experimental utilizado encontra-se ilustrado na .....50

3, salientando que o biorreator foi isolado utilizando como revestimento lã de rocha na sua área lateral.

As variáveis medidas para a determinação de U foram as temperaturas nos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 e 6, vazão alimentação de ar, vazão de alimentação de água no sistema de resfriamento e vazão de água no tubo interno.

A entrada de água no tubo interno oco era proveniente do banho termostaticado e teve valor pré-estabelecido.



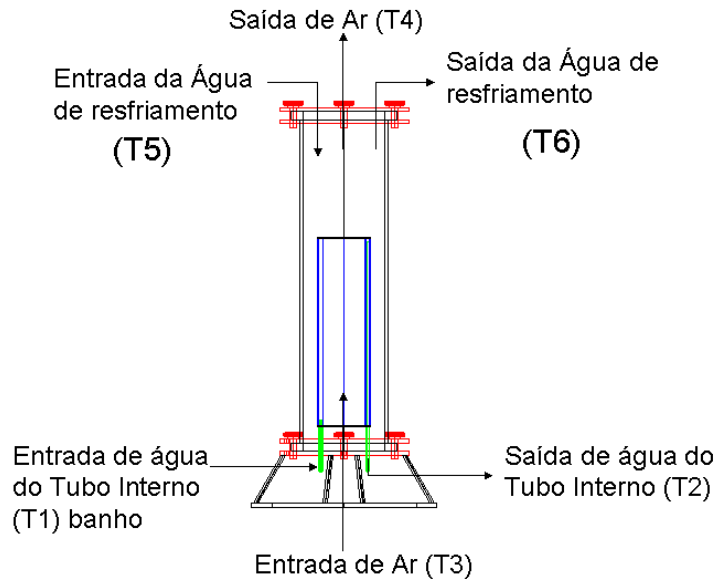


Figura 3-3 Esquema para determinação experimental do coeficiente global de transferência de calor.

Após checar todas as conexões e certificar a estabilidade da temperatura do banho, dava-se início ao experimento, observando-se a temperatura de todos os pontos até atingir-se o estado estacionário, normalmente por volta de quarenta minutos para total estabilização do sistema. Então, todas as temperaturas e vazões eram anotadas. Foram realizados trinta e três experimentos com diferentes estados estacionários.

O sistema contou com uma alimentação de água de resfriamento, pois para determinação de coeficiente global de troca térmica ( $U$ ), foi necessária uma diferença substancial entre as temperaturas do sistema ( $T_6$ ) e do tubo interno oco ( $T_2$ ). Com a alimentação de uma corrente de água no reator foi possível aumentar a diferença entre  $T_1$  e  $T_2$  e ter

maiores diferenças entre as temperaturas para maior precisão nos cálculos

Na Figura 3-4 apresenta-se em diagrama do balanço de energia realizado no biorreator airlift. A perda de energia para o ambiente foi considerada igual a zero, pois o reator foi totalmente isolado com lã de rocha.

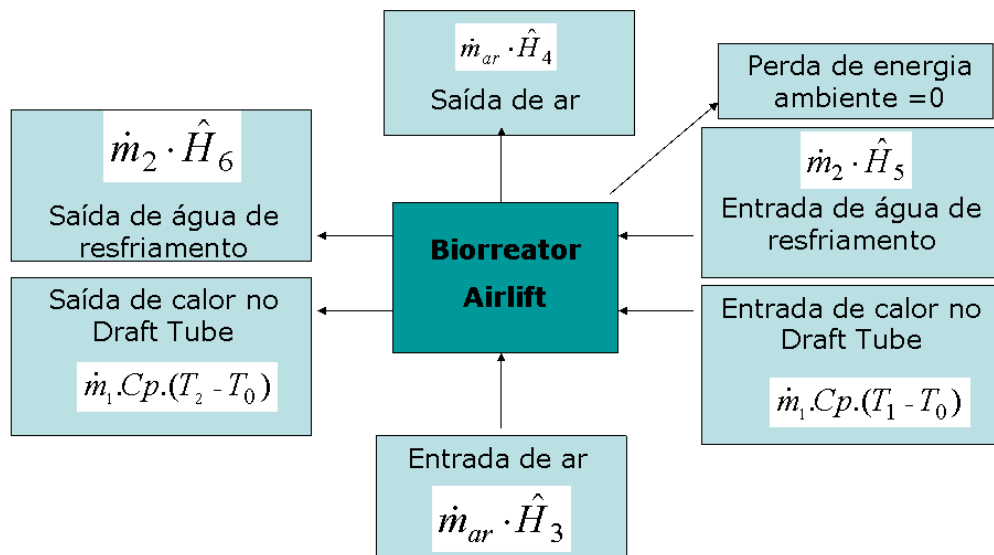


Figura 3-4 - Diagrama do balanço de energia do biorreator airlift

Para o cálculo do coeficiente global de troca térmica ( $U$ ) foi considerado que o tubo interno do biorreator airlift atuou como um trocador de calor de passagem única, resultando na seguinte equação:

$$\dot{Q} = U \cdot A \cdot \Delta T_m$$

Eq. 3-1

Onde:

$\dot{Q}$ : calor transferido por unidade de tempo do tubo interno oco para o interior do biorreator airlift (W);

U: coeficiente global de transferência de calor ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{°C}^{-1}$ );

$\Delta T_m$ : média logarítmica da diferença de temperatura ( $\text{°C}$ );

Onde:

$$\Delta T_m = \frac{(T_1 - T_5) - (T_2 - T_5)}{\ln\left(\frac{T_1 - T_5}{T_2 - T_5}\right)} \quad \text{Eq. 3-2}$$

A: área de troca térmica ( $0,255 \text{ m}^2$ ).

Os índices das temperaturas da equação 3-2 são referentes à Figura 3-3.

Para determinar a velocidade de transferência de calor do tubo interno oco para o interior do biorreator foi utilizada a equação 3-3:

$$\dot{Q} = \dot{m}_1 \cdot Cp \cdot (T_1 - T_2) \quad \text{Eq. 3-3}$$

Para diferentes condições experimentais foi determinado a temperatura de bulbo seco e bulbo úmido da corrente ar de entrada e saída do biorreator airlift. A partir dessas medidas, é também possível determinar a velocidade de transferência de calor, utilizando-se dados da corrente de ar. No entanto, foi escolhido realizar o cálculo utilizando o tubo interno oco, porque apresentou a maior diferença de temperatura e, portanto, maior precisão nos cálculos.

A área de troca térmica foi calculada, sendo somados a área

interna e externa do tubo interno. Conhecendo a média logarítmica da diferença de temperatura ( $\Delta T_m$ ) e velocidade de transferência de calor (Q), foram determinados valores do coeficiente global de transferência de calor (U) para diferentes condições experimentais testadas.

### **3.4 Avaliação de Transferência de Oxigênio**

A transferência de oxigênio foi avaliada a partir da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) nos biorreatores airlift e no convencional modelo Bioflo III (New Brunswick Scientific, Co) em diferentes condições de agitação e aeração. Valores de  $k_L a$  foram obtidos por dois métodos diferentes, método dinâmico e método do sulfito, o que permitiu comparar valores de  $k_L a$  nos dois biorreatores obtidos por diferentes métodos.

#### **3.4.1 Método Dinâmico considerando o Atraso da Resposta do Eletrodo**

O método dinâmico utilizado no presente trabalho, para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), foi proposto por Chisti (1989).

Para o cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio deve-se levar em conta o atraso do eletrodo, o qual ocorre devido ao fato de o oxigênio dissolvido no seio do líquido difundir através da membrana do eletrodo que isola o meio líquido da superfície do catodo, onde o oxigênio é reduzido gerando o fluxo de elétrons.

Com o objetivo de corrigir e identificar esse atraso do eletrodo, Aiba *et al.*(1973) propuseram que o sinal do eletrodo ( $C_e$ ), varia no tempo proporcionalmente à diferença entre a concentração real de oxigênio dissolvido ( $C$ ) e o sinal do eletrodo ( $C_e$ ), ou seja:

$$\frac{dC_e}{dt} = k_e (C - C_e) = \frac{1}{\tau_e} (C - C_e) \quad \text{Eq. 3-4}$$

Onde:

$C$ : concentração real de oxigênio dissolvido

$C_e$ : concentração de oxigênio dissolvido lido pelo eletrodo ou sinal do eletrodo.

$k_e$ : constante de atraso do eletrodo ( $s^{-1}$ )

$\tau_e$ : tempo de resposta do eletrodo (s)

A constante de atraso do eletrodo ( $k_e$ ) pode ser determinada através de um ensaio em degrau, ou seja, equilibrando-o em atmosfera de nitrogênio gasoso (eletrodo indicando o valor zero) e, em seguida, retirando o eletrodo da atmosfera de nitrogênio e introduzindo-o imediatamente no ar atmosférico.

Com os valores do sinal do eletrodo registrados em função do tempo, obtidos pela exposição do eletrodo ao ar atmosférico, obtém-se o tempo de resposta ( $\tau_e$ ) como sendo igual ao tempo onde o sinal do eletrodo atingiu 63,2 % do seu valor máximo, de acordo com a .....53

. A constante de atraso do eletrodo ( $k_e$ ) é calculada como sendo o inverso do tempo de resposta.

A simulação desse ensaio está representada na Figura 3-5, na qual pode-se ter uma clara idéia da determinação da constante de atraso do eletrodo ( $k_e$ ).

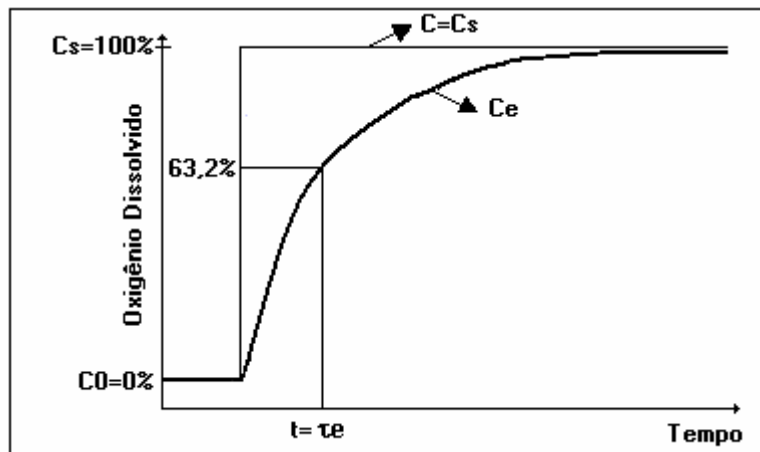


Figura 3-5 Representação esquemática da concentração do oxigênio em função do tempo para a definição da constante de atraso do eletrodo

O método dinâmico consiste em se dispor no biorreator, de um eletrodo para a determinação da concentração de oxigênio dissolvido. Aerando-se o sistema, calibra-se o eletrodo na posição 100% ( $C_e = C_s = 100$ ). Em seguida borbulha-se nitrogênio no líquido, a fim de eliminar todo o oxigênio dissolvido do meio, até que o eletrodo indique o valor zero ( $C = C_e = 0$ ).

A seguir, em um dado instante, inicia-se a aeração do meio líquido, nas condições em que se pretende obter o valor de  $k_{L,a}$ , passando-se então a registrar o sinal do eletrodo ( $C_e$ ) ao longo do tempo ( $t$ ). Esse sinal sai do zero, aumentando até atingir a saturação ( $C_s$ ), ou seja, até que o sinal do eletrodo indique o valor 100%.

Para a determinação do  $k_L a$  faz-se uso da Equação 3-5:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C_s - C) \quad \text{Eq. 3-5}$$

A Equação 3-5 é integrada para a condição inicial de  $C=C_0$  e  $t=t_0$  resultando na Equação 3-6:

$$C = C_s - (C_s - C_0) \cdot \exp^{-k_L a \cdot (t-t_0)} \quad \text{Eq. 3-6}$$

A determinação do  $k_L a$  pela Equação 3-5 seria estritamente correta somente se o eletrodo medisse a concentração real de oxigênio dissolvido. Na realidade, isto não ocorre devido ao atraso na resposta do eletrodo. Como mencionado anteriormente, o tempo de resposta do eletrodo ( $\tau_e$ ) pode ser descrito como uma equação de primeira ordem, como mostra a Equação 3-4.

Introduzindo-se na Equação 3-4 o valor de  $C$  em função do tempo, obtido a partir da Equação 3-6 e agora, integrando-se a equação resultante com a condição inicial  $C_e = C_{e0}$  ( $t = t_0$ ), obtém-se:

$$C_e = C_{e0} \cdot e^{-ke \cdot (t-t_0)} + C_{es} \cdot (1 - e^{-ke \cdot (t-t_0)}) + \frac{ke \cdot (C_{es} - C_0)}{ke - k_L a} \cdot (e^{-ke \cdot (t-t_0)} - e^{-k_L a \cdot (t-t_0)}) \quad \text{Eq. 3-7}$$

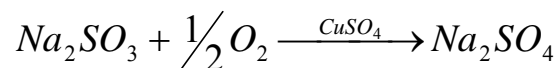
A partir dos resultados experimentais de  $C_e$  em função do tempo, pode-se, utilizando a Equação 3-7 e um algoritmo de Maquard obter o valor de  $k_L a$ , conhecendo-se previamente o valor de  $ke$ .

A transferência de oxigênio pelo método dinâmico foi avaliada em biorreatores Bioflo III e airlift em diferentes condições de aeração e ou

agitação, indicados na Tabela 3-1.

### 3.4.2 Método do Sulfito

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) foi determinado pelo método de sulfito modificado (Vilaça *et al.* 1999). Para tal, foram adicionados cristais de sulfito de sódio ( $\text{NaSO}_3$ ,  $8,83 \text{ g.L}^{-1}$ ) no biorreator airlift na presença do catalisador  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $0,70 \text{ g.L}^{-1}$ ) sob certa condição de aeração, ocorrendo a reação que segue:



Uma determinada quantidade de sulfito de sódio garante a concentração de oxigênio dissolvido próxima a zero durante um grande intervalo de tempo. Como a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida é etapa limitante do processo, a velocidade volumétrica de transferência de oxigênio ( $N_{\text{O}_2}$ ) pode ser calculada conhecendo-se a estequiometria da reação, a quantidade de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  adicionada e o tempo decorrido para a reação completar-se.

$$N_{\text{O}_2} = \frac{0,5 \cdot n}{V \cdot \Delta t}$$

Eq. 3-8

Onde:

$n$  = número de moles de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (mols)

$V$  = volume de reação (L)

$\Delta t$  = tempo decorrido (s)

A concentração de saturação do oxigênio dissolvido ( $C_s$ ) é



calculada pela equação que segue, desprezando o efeito da presença de sais no meio reacional.

$$C_s = H_e \cdot Y_{O_2}^e \cdot P_T \quad \text{Eq. 3-9}$$

Onde:

$H_e$  = constante de Henry ( $1,557 \cdot 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ );

$Y_{O_2}^e$  = fração molar de oxigênio no gás de entrada;

$P_T$  = pressão total do sistema (absoluta).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) pode ser calculado a partir do valor da velocidade de transferência de oxigênio ( $N_{O_2}$ ) e da concentração de saturação de oxigênio na água ( $C_s$ ):

$$k_L a = \frac{N_{O_2}}{C_s} \quad \text{Eq. 3-10}$$

A presença de sulfito de sódio nesse método formou o meio não coalescente, impedindo a união das bolhas, o que leva a um aumento na área interfacial de troca de massa e por conseqüência, no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ).

### **3.5 Avaliação do arraste de água do sistema biorreator mais condensador**

Biorreator airlift opera com altas vazões de ar (1 a 5 vvm), a passagem de ar pelo sistema acaba provocando um arraste de água para fora do biorreator, fazendo com que ocorra uma diminuição do nível de

líquido ao longo dos cultivos, podendo numa situação limite, o nível chegar à altura do tubo interno e impedir a circulação do meio reacional, o que levaria o sistema a um colapso em termos de transferência de calor e massa.

A solução encontrada para este problema foi a construção de um condensador (Cassiano Filho, 2003). No entanto, mesmo operando com o condensador, fez-se necessário a quantificação desse arraste, uma vez que se pretende utilizar o equipamento em cultivos de longa duração.

Utilizou-se para este procedimento dois banhos termostatizados para controlar as temperaturas do biorreator e do condensador. O condensador contém 16 tubos internos com diâmetro 5,5 mm e comprimento igual a 30 cm, apresentando uma área de troca térmica de 830 cm<sup>2</sup>. A Figura 3-2 que segue, ilustra o condensador acoplado.

Foram realizados vinte e quatro experimentos, variando a temperatura do biorreator airlift (25 e 35 °C), temperatura do condensador (15 e 25 °C) e vazão de alimentação de ar, 6, 18 e 30 Lmin<sup>-1</sup>, 1, 3 e 5 vvm respectivamente.

No início de cada ensaio, o biorreator foi alimentado com 6 Litros de água. O sistema operou de 8 a 24 horas dependendo da velocidade de arraste. No final mediu-se o volume restante de água no biorreator. A perda de água foi calculada como sendo a diferença entre os volumes inicial e final.

O mesmo procedimento foi realizado sem a presença do condensador, tendo como objetivo poder avaliar a eficiência do mesmo

em termos de retenção de água, sendo a eficiência do condensador calculada segundo a equação que segue:

$$Eficiência = \frac{Perda_{semcondensador} - Perda_{condensador}}{Perda_{semcondensador}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3-11}$$

### **3.6 Cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para a produção do ácido clavulânico**

#### **3.6.1 Microrganismo**

Nos ensaios realizados, foi utilizada a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, adquirida da American Type Culture Collection. Com o intuito de se evitar problemas ligados a viabilidade dos microrganismos durante os cultivos, foram preparados estoques de células preservadas em criotubos de 5 mL, contendo 3,5 mL de células vegetativas congeladas a -70°C em ultrafreezer, em solução crioprotetora de glicerol (20% v/v).

#### **3.6.2 Preservação do microrganismo e preparação de criotubos**

A preservação da bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 a partir de sua forma liofilizada se deu da seguinte maneira:

- Preparou-se 5 tubos de ensaio com 5 mL de meio de cultura líquido para recuperação contendo: triptona (5 g.L<sup>-1</sup>); extrato de levedura (3 g.L<sup>-1</sup>), e água destilada, q.s.p.(1L), pH 7,0 -7,2.

- Transferiu-se de 0,5 a 1 mL desse meio de um dos tubos com pipeta de Pasteur para o frasco de liofilizado para hidratar o micélio. Retornou-se este volume para o tubo de ensaio original.

- Partindo deste tubo inoculou-se os tubos restantes, cerca de 1 mL para cada um dos quatro tubos restantes, sendo os mesmos mantidos por um período de 7 a 10 dias a 30 °C.

- Após este período, transferiram-se os conteúdos de cada 2 tubos para erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL de meio líquido para a propagação do micélio (inóculo de 20 % v/v): glicerol 20,0 g; extrato de levedura 1,0 g; peptona bacteriológica 10,0 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,75 g;  $K_2HPO_4$  2,5 g; solução de sais: ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (1,0 g);  $FeSO_4 \cdot H_2O$  (1,0 g);  $ZnSO_4 \cdot H_2O$  (1,0 g)), água destilada, q.s.p 1 L, pH 6,8 ajustado com NaOH.

- Incubou-se em mesa incubadora a 30 °C por 24 horas, após este período diluiu-se as suspensões com glicerol de modo a conter 10 % v/v e foram transferidos 3,5 mL desta suspensão para criotubos de 4 mL e estes congelados a -70 °C, constituindo-se o estoque de trabalho.

### 3.6.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho tiveram como base as pesquisas realizadas até o momento na Área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar referentes à produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

### 3.6.3.1 Meio de cultura de Reativação (MR)

O meio de cultura de reativação teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0); peptona bacteriológica (10,0); MOPS (“3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid”) (21,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,5). A solução de sais teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0).

O pH foi ajustado em 6,8 com NaOH e o meio autoclavado por 15 minutos a 120 °C.

### 3.6.3.2 Meio de cultura de Inóculo (MI)

O meio de cultura de inóculo teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0); MOPS (“3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid”) (21,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,75);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,8); Samprosoy 90 NB (20,0); óleo de soja (1,0). A solução de sais teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0).

O pH foi ajustado em 6,8 com NaOH e o meio autoclavado por 15 minutos a 120 °C.

### 3.6.3.3 Meio de cultura de Produção (MP)

O meio de cultura de produção (MP) teve a mesma composição do meio de cultura de inóculo (MI) excetuando-se o tampão MOPS e adicionando-se  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de antiespumante (“Dow Corning Medical Antifoam C Emulsion – 30% Dimethicone Emulsion USP”).

### **3.6.4 Cultivo em Biorreatores para a produção de ácido clavulânico**

A partir de valores de  $k_La$  obtidos em diferentes condições de agitação e/ou aeração nos biorreatores airlift e Bioflo III, foram realizados dois cultivos em biorreatores convencional e dois cultivos em biorreator airlift e em duas diferentes condições de transferência de oxigênio visando a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Os cultivos em biorreator Bioflo III foram realizados a 600 e 800 rpm e 0,5 vvm os cultivos em biorreator airlift foram realizados a 3 e 4,08 vvm, que, de acordo com os resultados, definem mesmas condições de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) nos biorreatores.

#### **3.6.4.1 Reativação**

Na etapa de reativação foram inoculados 4 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio de reativação (MR), cada um deles com um criotubo conservado sob congelamento em solução de glicerol 10% v/v a -70 °C. Os Erlenmeyers eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas, a 28 °C a 250 rpm. Ao final, os conteúdos dos dois frascos eram reunidos para utilização na etapa de preparação de inóculo.

#### **3.6.4.2 Etapa de Preparação do Inóculo**

Na etapa de preparação do inóculo, 20 erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de inoculação (MI) eram inoculados com 5 mL da suspensão de células obtida na etapa de reativação. Os erlenmeyers

eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas a 28 °C e 250 rpm. Ao final, os conteúdos dos frascos eram reunidos para inoculação do reator, sendo 400 mL para o biorreator convencional de bancada tipo tanque agitado e aerado, modelo BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. Inc. (USA) e 600 mL para o biorreator airlift.

#### **3.6.4.3 Cultivos em Batelada**

Todos os cultivos foram realizados em batelada, sendo dois no biorreator airlift e dois no biorreator convencional Bioflo III. Os biorreatores apresentam de sistemas de medida de concentração de oxigênio dissolvido, controle de pH, temperatura e vazão de ar, sendo que o biorreator convencional apresenta também e controle da frequência de rotação dos impelidores. Os cultivos foram realizados nas seguintes condições de agitação e/ou aeração:

Tabela 3-1 Características dos cultivos realizados em biorreator airlift e convencional

Nome	Biorreator	Vazão de ar (vvm)	Rotação (rpm)
B1	Convencional	0,50	600
A1	Airlift	3,00	-
B2	Convencional	0,50	800
A2	Airlift	4,08	-

Os ensaios em biorreator convencional foram realizados com um volume útil de 4 L, sendo 3,6 L do meio de produção (MP) e 0,4 L (10% v/v) de inóculo, preparado em mesa incubadora rotativo. Os ensaios em biorreator airlift foram realizados com um volume útil de 6 L, sendo 5,4 L do meio de produção (MP) e 0,6 L de inoculo (10% v/v), preparado em mesa incubadora rotativo.

Os ensaios A1 e B1 foram realizados em condições operacionais que definem o mesmo valor de  $k_L a$  de  $137 \text{ h}^{-1}$ , determinado previamente, assim como os ensaios A2 e B2 também foram realizados num outro valor de  $k_L a$  de  $199,7 \text{ h}^{-1}$ .

Os cultivos tiveram duração entre 54 a 60 horas e foram realizados aos pares, sendo primeiro os cultivos A1 e B1, seguido dos cultivos A2 e B2. Amostras de 30 mL foram retirados de seis em seis horas para análise da concentração de glicerol ( $C_{\text{glic}}$ ), índice de consistência do caldo ( $k$ ), concentração de ácido clavulânico ( $C_{\text{ac}}$ ) e índice de comportamento



do fluido (n). A concentração de oxigênio dissolvido foi medida da cada uma hora de cultivo.

#### **3.6.4.4 Aspectos práticos na execução dos ensaios**

Durante a execução dos cultivos foram encontradas algumas dificuldades, entre quais cabe destacar a formação de espuma.

A grande formação de espuma altera o nível de líquido no reator o que pode causar o arraste do caldo fermentativo, bem como sua contaminação. Para minimizar a formação de espuma no reator é adicionado antiespumante, que embora resolva o problema da espuma, provoca interferência no oxigênio dissolvido. Para evitar essas perturbações optou-se por utilizar nos ensaios uma suspensão de antiespumante diluído dez vezes em água. Para aperfeiçoar o cultivo entrou-se em contato com a Empresa Try-On, que desenvolveu conjuntamente um controlador de antiespumante, baseado no controle de nível de espuma. Quando a espuma atinge o contato, na altura desejada, fecha-se o circuito e o equipamento liga a bomba peristáltica, que injeta antiespumante no biorreator de forma programada. O teste foi realizado no cultivo B2, e os resultados obtidos foram bastante satisfatórios.

### **3.6.5 Métodos Analíticos**

#### **3.6.5.1 Determinação da concentração de glicerol (Cs)**

O glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lompak-

Warters) e como eluente (fase móvel) água Mili-Q. O equipamento foi operado a 34°C e 1,0 mL/min e tempo de retenção de 13 minutos.

As amostras foram diluídas em balões volumétricos e filtradas com a finalidade de primeiro garantir que estivessem dentro da faixa de calibração e segundo para assegurar que estivessem livres de sólidos em suspensão. A curva de calibração foi construída com a injeção de amostras nas seguintes concentrações 0,1; 0,25 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

#### **3.6.5.2 Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico (Cp)**

A concentração de ácido clavulânico foi determinada pelo método de espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982), que se baseia na derivatização do ácido clavulânico com uma solução de imidazol e leitura de absorvância utilizando o comprimento de onda de 311 nm de feixe ultravioleta. Este método foi realizado como descrito na seqüência:

Leitura da Absorvância A (ABS<sub>A</sub>):

- Em tubos de ensaios são adicionados 5 mL de solução de imidazol (60 g.L<sup>-1</sup> e pH 6,8) em 1 mL de amostra ou padrão contendo ácido clavulânico em concentração inferior a 50 mg.L<sup>-1</sup> e a mistura são incubadas por 15 minutos a 30°C.

- Em um tubo de ensaio são misturados 1 mL de água com 5 mL da mesma solução de imidazol, sendo a mistura incubada sob as mesmas condições.

- A leitura “zero” do espectrofotômetro é ajustada utilizando a solução obtida no passo anterior e em seguida é realizada a leitura do

meio reacional obtido no primeiro passo e anotado o valor da absorvância ( $ABS_A$ ).

Leitura da Absorvância B ( $ABS_B$ )

- Em tubos de ensaios, uma mistura contendo 5 mL de água destilada e 1 mL de amostra ou padrão contendo ácido clavulânico é incubada por 15 minutos a 30°C.

- A leitura “zero” do espectrofotômetro é ajustada utilizando água e em seguida a leitura da absorvância da solução obtida no primeiro passo e anotada o valor de  $ABS_B$ .

Calcula-se o valor da absorvância do composto derivatizado utilizado a equação:  $ABS = ABS_A - ABS_B$ .

A curva de calibração da concentração do composto derivatizado é linear com a absorvância (ABS) para concentrações de ácido clavulânico menores que 50 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.6.5.3 Medidas Reológicas

Os comportamentos reológicos dos caldos de fermentação foram avaliados utilizando-se um reômetro Brookfield, modelo LV-DVIII+ munido de dispositivos de cilindros concêntricos.

Foram obtidos reogramas, ou seja, curvas de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função do gradiente de velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ). Supondo serem os fluidos pseudoplásticos o modelo da velocidade de cisalhamento dado pela equação que se segue da Lei da Potência foi ajustado aos valores experimentais:

$$\tau = K \cdot \gamma^n$$

Eq. 3-12

onde:

K: índice de consistência (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)

n: índice de comportamento do escoamento (-)

Os valores dos parâmetros reológicos K e n foram obtidos por regressão não linear, sendo que o valor do índice de consistência (k) tem forte relação com a concentração celular (C<sub>x</sub>) sendo um parâmetro importante de acompanhamento da fermentação. Já que em termos de concentração de células apresentam sólidos insolúveis em suspensão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação do coeficiente global de transferência de calor (U)

O sistema antigo de troca de calor do biorreator airlift era por encamisamento externo por serpentina de silicone. Este tipo de aquecimento era pouco eficaz, não mantendo o caldo de fermentação na temperatura desejada.

Para melhorar essa característica do biorreator, foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica DEQ/UFSCar o sistema de aquecimento onde o líquido de aquecimento passa dentro do tubo interno que foi construído com um espaço interno.

Nos ensaios realizados, o coeficiente global de transferência de calor (U) variou com três parâmetros, vazão específica de água no interior do tubo interno ( $\phi_{TI}$ ), vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ) e vazão específica de água para resfriamento ( $\phi_{resf}$ ) do sistema. Cabe informar que as vazões específicas foram calculadas como sendo as vazões volumétricas divididas pelos volumes do tubo interno (0,38 L) e do biorreator (6 L).

A tabela 4-1 apresenta os valores do coeficiente global de troca térmica (U) nas diferentes condições de operação empregadas.

Tabela 4-1 Valores do coeficiente global de troca térmica (U) em diferentes condições de operação.

Ensaio	$\phi_{TI}$ (s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>2</sup>	$\phi_{resf}$ (s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>3</sup>	$\phi_{ar}$ (s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>2</sup>	U (W.m <sup>-2</sup> .°C <sup>-1</sup> )
1	1,38	0,70	1,67	328,5
2	1,38	0,70	3,33	333,4
3	1,38	0,70	5,00	426,8
4	1,38	1,27	1,67	299,1
5	1,38	1,27	3,33	351,1
6	1,38	1,27	5,00	303,2
7	1,38	1,94	1,67	311,0
8	1,38	1,94	3,33	314,7
9	1,38	1,94	5,00	314,7
10	2,89	0,70	1,67	527,2
11	2,89	0,70	3,33	503,9
12	2,89	0,70	5,00	571,5
13	2,89	1,27	1,67	429,8
14	2,89	1,27	3,33	472,0
15	2,89	1,27	5,00	484,8
16	2,89	1,94	1,67	429,8
17	2,89	1,94	3,33	478,5
18	2,89	1,94	5,00	478,5
19	4,10	0,70	1,67	609,6
20	4,10	0,70	3,33	609,6
21	4,10	0,70	5,00	645,6
22	4,10	1,27	1,67	555,4
23	4,10	1,27	3,33	555,4
24	4,10	1,27	5,00	555,4
25	4,10	1,94	1,67	525,0
26	4,10	1,94	3,33	634,0
27	4,10	1,94	5,00	305,3
28	1,38	5,84	5,55	465,6
29	3,01	3,24	5,55	677,9
30	4,35	1,12	5,55	636,0
31	3,42	1,12	5,55	466,0
32	2,24	1,08	5,55	436,8
33	2,89	0,98	5,55	321,6

Em posse dos dados experimentais da Tabela 4-1, foi proposto um modelo que relacionasse os valores de U com as variáveis estudadas, do tipo:

$$z = P1 \cdot x^{P2} \cdot y^{P3} \cdot w^{P4} \quad \text{Eq. 4-1}$$

Onde a variável dependente (z) é o coeficiente global de transferência de calor (U), e as variáveis independentes:  $\phi_{TI}$ ,  $\phi_{resf}$  e  $\phi_{ar}$ , respectivamente.

O ajuste da correlação com o auxílio do software Microcal Origin 7.0 pelo algoritmo de regressões não lineares Levenberg-Marquardt.

$$U = 2272,80 \cdot \phi_{TI}^{0,543} \cdot \phi_{ar}^{0,088} \cdot \phi_{resf}^{-0,104} \quad \text{Eq. 4-2}$$

Onde:

Coeficiente global de transferência de calor (U) ( $\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ );

Vazão específica de água no tubo interno  $\phi_{TI}$  ( $\text{s}^{-1}$ );

Vazão volumétrica de alimentação de ar  $\phi_{ar}$  ( $\text{s}^{-1}$ );

Vazão específica de água do sistema  $\phi_{resf}$  ( $\text{s}^{-1}$ ).

Os valores dos parâmetros ajustados com os respectivos erros, considerando grau de confiança de 95% e o correspondente coeficiente de correlação são apresentados na seqüência:

$$\begin{aligned} P1 &= 2272,80 \quad \pm \quad 517,20 \\ P2 &= 0,543 \quad \pm \quad 0,032 \\ P3 &= 0,088 \quad \pm \quad 0,025 \\ P4 &= - 0,104 \quad \pm \quad 0,026 \\ R^2 &= 0,93 \end{aligned}$$

Conclui-se que o ajuste foi bom e que o fator que mais influencia o U é a vazão específica de água no tubo interno ( $\phi_{TI}$ ). Atuando diminuindo a espessura estagnada no interior do tubo interno e, conseqüentemente

aumentando o valor do coeficiente convectivo interno. As medidas foram realizadas em uma faixa de vazão específica onde foi possível medir uma diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) no termômetro com pequeno erro.

O segundo parâmetro que mais influenciou  $U$  foi a vazão específica de ar, pois atua diminuindo a espessura da película estagnada no lado externo do tubo interno. Quanto à terceira variável, a vazão específica de água ( $\phi_{resf}$ ) do sistema, já era esperado que a mesma influenciasse negativamente a transferência de calor, pois retira calor de sistema.

Os valores do coeficiente global de transferência de calor ( $U$ ) ficaram na faixa de 300 a 700  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ , dentro da faixa indicada por MacAdams (1954) (300 a 17.000  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ ) para trocadores de calor. Os valores obtidos de  $U$  não foram maiores, pois se trabalhou com baixas vazões de água no tubo interno para obter precisão nas medidas.

Holman (1983) apresenta valor do coeficiente global de transferência de calor para o trocador de calor água-água entre valores de 850 a 1700  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ . Comparando com o sistema do presente trabalho, os resultados podem ser considerados bastante satisfatório pois se trabalhou com água-ar e obteve-se um valor máximo de 700  $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$ .

Os valores indicados na literatura referem-se ao coeficiente individual de transferência de calor ( $h$ ). No presente trabalho determinou-se o coeficiente global de transferência de calor ( $U$ ), função dos coeficientes individuais das películas estagnadas interna ( $h_i$ ) e externa ( $h_e$ ) ao tubo oco e da condutividade térmica do aço inoxidável ( $k$ ). Como



apresenta alto valor e a espessura da parede de metal é muito pequena, o cálculo de  $U$  fica condicionado aos valores dos coeficientes individuais ( $h_i$  e  $h_e$ ) que são funções das vazões de fluidos no interior e no exterior do tubo oco. Em outras palavras, não foi possível, nas condições ensaiadas determinar as contribuições individuais de  $h_i$  e  $h_e$  no cálculo de  $U$ . Como, por razões experimentais, a faixa de vazão de água no interior do tubo oco foi limitada ( $5,3$  a  $16,5 \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}$ ), pode-se deduzir que os valores encontrados para  $U$  localizados no início da faixa de literatura foram limitados por esta razão.

Os valores de  $U$  mostraram-se bastante satisfatórios em relação ao sistema antigo de aquecimento utilizado neste mesmo biorreator airlift que era com encamisamento externo, para um exemplo qualitativo, o tempo para estabilização de temperatura partindo-se de  $20$  até  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  diminuiu de uma hora para dez minutos, mostrando a melhora significativa no biorreator airlift de circulação interna com o encamisamento interno.

Para ilustrar a fidelidade do ajuste no Gráfico da Figura 4-1, pode-se concluir que os valores de  $U$  calculados diferiram dos valores de  $U$  experimentais dentro de uma faixa de  $10\%$  de erro, que pode ser considerado bastante satisfatório para o ajuste.

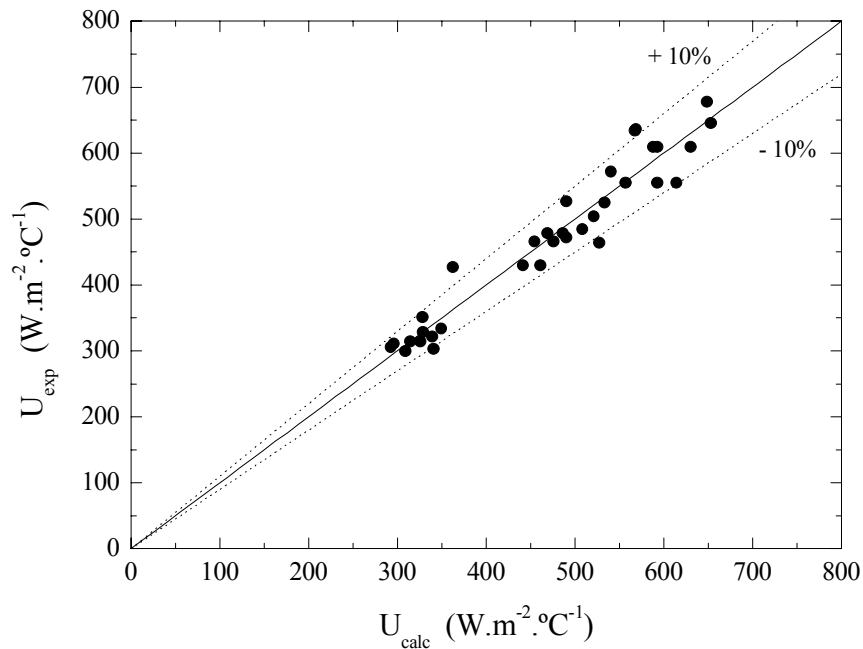


Figura 4-1 - Gráfico do U calculado em função de U experimental.

## **4.2 Avaliação do arraste de água do sistema biorreator mais condensador**

Avaliar o arraste de água do biorreator airlift é um estudo necessário, pois para operações durante longos períodos a perda de água é um fator que interfere de forma muito importante no funcionamento do biorreator durante cultivos de microrganismos.

Para o referido estudo foram relacionados três parâmetros, importantes que interferem na quantidade de água arrastada: temperatura do biorreator ( $T_B$ ), temperatura do condensador ( $T_C$ ) e a vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ).

Na Tabela 4-2, são apresentados dados do experimento para avaliar o arraste de água do biorreator airlift com condensador.

Tabela 4-2 Dados experimentais da avaliação do arraste de água do biorreator airlift

$T_b$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\phi_{ar}$ (vvs)	Arraste (mL.h <sup>-1</sup> )	Perda horária (%/h)	Eficiência (%)
25	15	0,05	18,4	0,31	37,3
35	15	0,05	24,3	0,41	47,7
25	25	0,05	20,4	0,34	30,5
35	25	0,05	34,0	0,57	26,7
35	25	0,0167	12,6	0,21	27,9
25	25	0,0167	7,2	0,12	39,2
25	15	0,0167	1,9	0,03	84,2
35	15	0,0167	5,1	0,09	70,8
35	25	0,0833	60,0	1,00	31,2
25	25	0,0833	57,1	0,95	—
35	15	0,0833	40,0	0,67	54,2
25	15	0,0833	39,1	0,65	26,6

A perda horária em %.h<sup>-1</sup> refere-se a perda de água do biorreator relativo em relação ao volume inicial de 6 Litros.

A eficiência em % relaciona a perda horária do biorreator com condensador e a perda horária do biorreator sem condensador. É

calculada como sendo a diferença entre as perdas, dividindo pela perda de água do biorreator sem condensador.

Foram realizados doze experimentos e relacionados a perda horária com a temperatura do condensador ( $T_{\text{Cond.}}$ ), temperatura do biorreator ( $T_{\text{Meio}}$ ) e com a vazão de ar ( $\phi_{\text{ar}}$ ) do tipo da Equação 4-1 foi ajustada aos valores experimentais.

A Equação 4-3 expressa a correlação ajustada com o auxílio do software Microcal Origin 7.0 pelo algoritmo de regressões não lineares Levenberg-Marquardt.

$$Perda = 0,669 \cdot \phi_{Ar}^{1,30} \cdot T_{cond}^{0,73} \cdot T_{meio}^{0,37} \quad \text{Eq. 4-3}$$

Onde:

Perda horária de água (Perda): (% / h);

Temperatura do condensador ( $T_{\text{cond}}$ ): (°C);

Vazão de alimentação de ar ( $\phi_{\text{ar}}$ ): (vvs);

Temperatura do biorreator ( $T_{\text{Meio}}$ ): (°C).

Os valores dos parâmetros ajustados com os respectivos erros, considerando 95% de grau de confiança, juntamente com o coeficiente de correlação são apresentados na seqüência:

$$P1 = 0,669 \pm 0,602$$

$$P2 = 1,30 \pm 0,13044$$

$$P3 = 0,73 \pm 0,14341$$

$$P4 = 0,37 \pm 0,206$$

$$R2 = 0.97$$

O coeficiente de correlação foi de 0,97 mostra que o modelo descrito descreve muito bem os dados experimentais.

No gráfico da Figura 4-2 mostra-se que a maioria dos valores de arraste calculado diferem dos valores de arraste experimental dentro de uma faixa de 10% de erro, que é considerado bastante satisfatório para o ajuste.

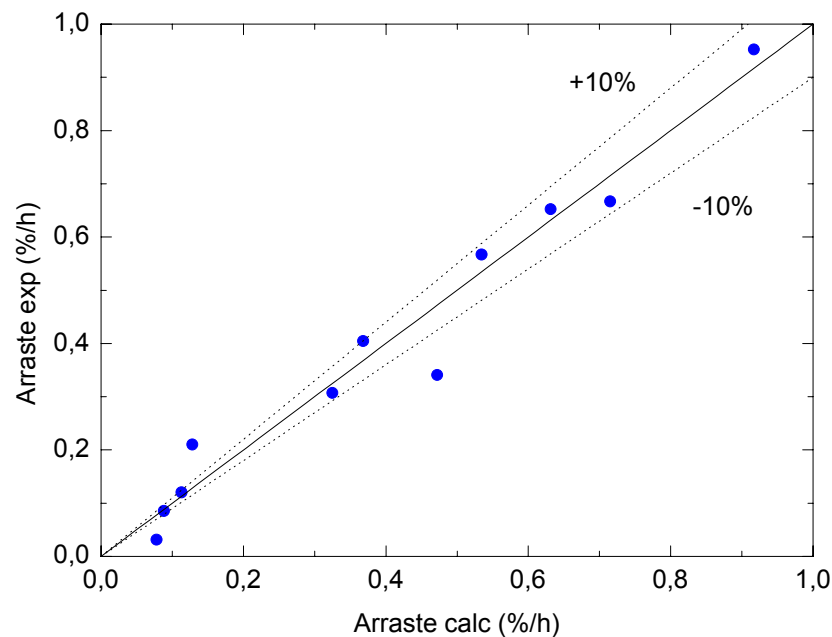


Figura 4-2 - Gráfico do arraste calculado versus arraste experimental.

Conclui-se que o fator que mais contribui para o aumento de perda de água é a vazão de ar, pois é o fenômeno responsável pelo arraste de vapor por um gás não condensável, que é conhecido como “stripping”. Parte da água arrastada está na forma de vapor em equilíbrio com a fase líquida e parte é arrastada mecanicamente pelo arrasto de gás.

O segundo parâmetro que influenciou para perda de água foi a temperatura do condensador. Quanto maior a temperatura do condensador maior o arraste de água para fora do sistema.

O terceiro parâmetro considerado foi a temperatura no interior do biorreator, que apresentou uma contribuição pequena, mas importante para o aumento da perda de água.

### ***4.3 Avaliação da transferência de oxigênio.***

Para a validação do sistema airlift como biorreator para uso comercial faz se necessário também a avaliação de capacidade de transferência de oxigênio. O parâmetro mais amplamente utilizado para quantificar a transferência de oxigênio em biorreatores é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ).

Tal como citado no item Materiais e Métodos, os valores de  $k_L a$  foram determinados pelo método dinâmico considerando o atraso da resposta do eletrodo.

A constante do atraso do eletrodo ( $k_e$ ) foi obtida em triplicata como sendo igual a  $0,0769 \text{ s}^{-1}$ .

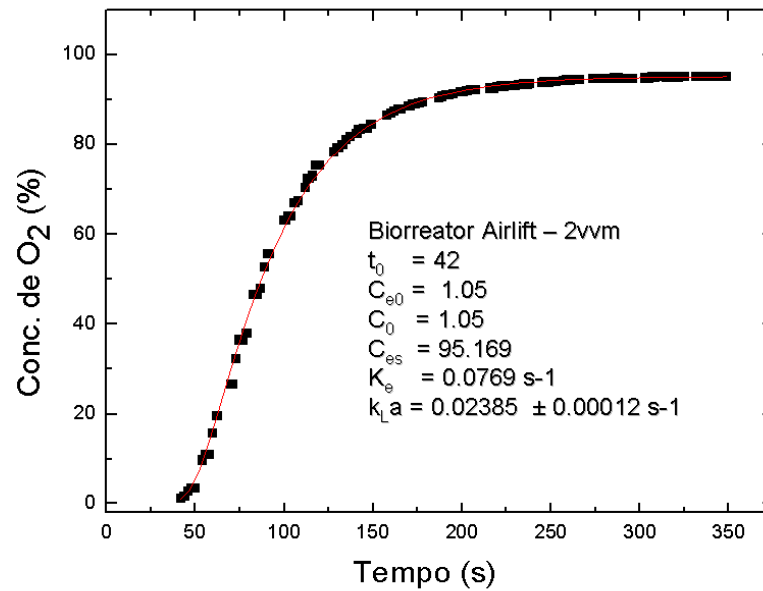


Figura 4-3 - Exemplo do ajuste do modelo para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

O gráfico da Figura 4-3 apresenta um exemplo do ajuste do modelo expresso pela Equação 3-7 para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), onde pode-se observar o excelente ajuste obtido.

Na Tabela 4-3 apresenta os valores de  $k_{La}$  obtidos no biorreator airlift operado em diferentes condições de aeração.

Tabela 4-3 Valores do  $k_La$  para biorreator airlift para vazões específicas de ar de 1 a 5 vvm

Vazão de ar (vvm)	$U_{GS}$ ( $m \cdot s^{-1}$ )	$k_La$ ( $s^{-1}$ )	$k_La$ ( $h^{-1}$ )
1,0	0,0199	0,0157	56,5
1,5	0,0298	0,0160	57,5
2,0	0,0398	0,0238	85,9
2,5	0,0497	0,0279	100,6
3,0	0,0597	0,0322	115,8
3,5	0,0696	0,0482	173,6
4,5	0,0895	0,0606	218,1
5,0	0,0995	0,0714	257,0

Os resultados obtidos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) foram correlacionados com a velocidade superficial do gás ( $U_{GS}$ ) a partir da correlação já conhecida e representada por Barboza *et. al* (2000) pela equação 4-4 onde  $y$  é a variável dependente ( $k_La$ ) e  $x$  a variável independente ( $U_{GS}$ ).

$$y = P1 \cdot x^{P2} \quad \text{Eq. 4-4}$$

A equação 4-5 ilustra a correlação ajustada considerando o grau de confiança de 95%:

$$k_La = 0,985 \cdot U_{GS}^{1,16} \quad \text{Eq. 4-5}$$

Onde:



$k_{La}$ : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ );

$U_{GS}$ : velocidade superficial do gás ( $m.s^{-1}$ )

Na seqüência são apresentados os parâmetros da Equação 4-5 ajustados com os respectivos erros, bem como o coeficiente de correlação obtido no ajuste, mostrando que o modelo proposto ajustou-se adequadamente aos valores experimentais.

$$\begin{array}{ll} P1 & 0,985 \pm 0,3437 \\ P2 & 1,16 \pm 0,1284 \\ R^2 & = 0,96 \end{array}$$

A Figura 4-4 ilustra a correlação obtida (equação 4-5) ajustada aos valores experimentais de  $k_{La}$  em função da velocidade superficial do gás.

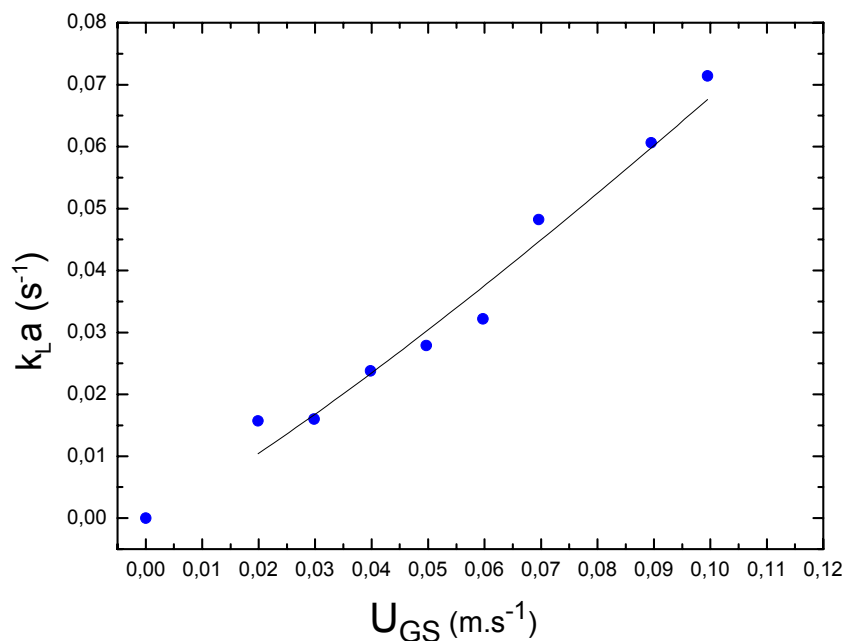


Figura 4-4 - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio  $k_{La}$  em função da vazão de ar ( $\phi_{ar}$ ).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) também foi determinado para o biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado Bioflo III a 28°C operado diferentes condições de agitação (600, 800 e 1000 rpm) e aeração (0,5 e 1,0 vvm) normalmente utilizadas em cultivos.

A Tabela 4-4 apresenta os valores de  $k_{La}$  obtidas para o biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado.

Tabela 4-4 Valores de  $k_{La}$  para biorreator convencional em diferentes condições de agitação e aeração.

Vazão de ar (vvm)	Rotação (rpm)	$k_{La}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )
0,5	600	0,0380	136,8
1,0	600	0,0453	163,0
0,5	800	0,0555	199,7
1,0	800	0,0636	228,9
0,5	1000	0,0657	236,6
1,0	1000	0,0729	262,5

Para encontrar condições de operação ( $\phi_{ar}$ ) no biorreator airlift que definem mesmos valores de  $k_{La}$  encontrados no biorreator convencional, foi utilizada Equação 4-5. Substituindo-se os valores de  $k_{La}$  obtidos em diferentes condições de agitação e aeração, foi possível calcular condições de aeração correspondentes no biorreator airlift. A Tabela 4-5 apresenta os resultados encontrados.

Tabela 4-5 Condições de aeração no biorreator airlift que definem os mesmos valores de  $k_La$  encontrados no biorreator convencional.

Biorreator convencional			Biorreator airlift
N (rpm)	$\phi_{ar}$ (vvm)	$k_La$ ( $h^{-1}$ )	$\phi_{ar}$ (vvm) (Equação 4-5)
600	0,5	136,8	2,98
600	1,0	163,0	3,44
800	0,5	199,7	4,08
800	1,0	228,9	4,59
1000	0,5	236,6	4,77
1000	1,0	262,5	5,20

#### ***4.4 Comparação entre consumos de potência de sistemas gaseificados por unidade de volume e transferência de oxigênio nos biorreatores airlift e convencional***

Os consumos de potência dos sistema gaseificados por unidade de volume foram calculado para biorreator airlift e biorreator convencional nos diferentes condições de operação.

A Tabela 4.6 apresenta os valores dos consumos de potência por unidade de volume e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar

( $\phi_{ar}$ ) para biorreator airlift e para diferentes condições de agitação e aeração para biorreator convencional (Bioflo III).

Tabela 4-6 – Potências transferidas por unidade de volume e  $k_La$  em diferentes condições de operação área para os biorreatores airlift e convencional.

Biorreator Convencional				Biorreator Airlift		
Rotação (rpm)	Vazão de ar (L.min <sup>-1</sup> )	Pg/V (W.L <sup>-1</sup> )	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )	Vazão de ar (L.min <sup>-1</sup> )	Pg/V (W.L <sup>-1</sup> )	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )
600	2,0	4,58	136,8	6,0	0,070	56,5
600	4,0	3,84	163,0	9,0	0,105	57,5
800	2,0	11,33	199,7	12,0	0,140	85,9
800	4,0	09,51	228,0	15,0	0,175	100,6
1000	2,0	22,89	236,6	18,0	0,211	115,8
1000	4,0	19,22	262,5	21,0	0,246	173,6
				27,0	0,316	218,1
				30,0	0,351	257,0

O gráfico da Figura 4-5 ilustra os valores de consumo de potência do sistema gaseificado por unidade de volume em função do  $k_La$ .

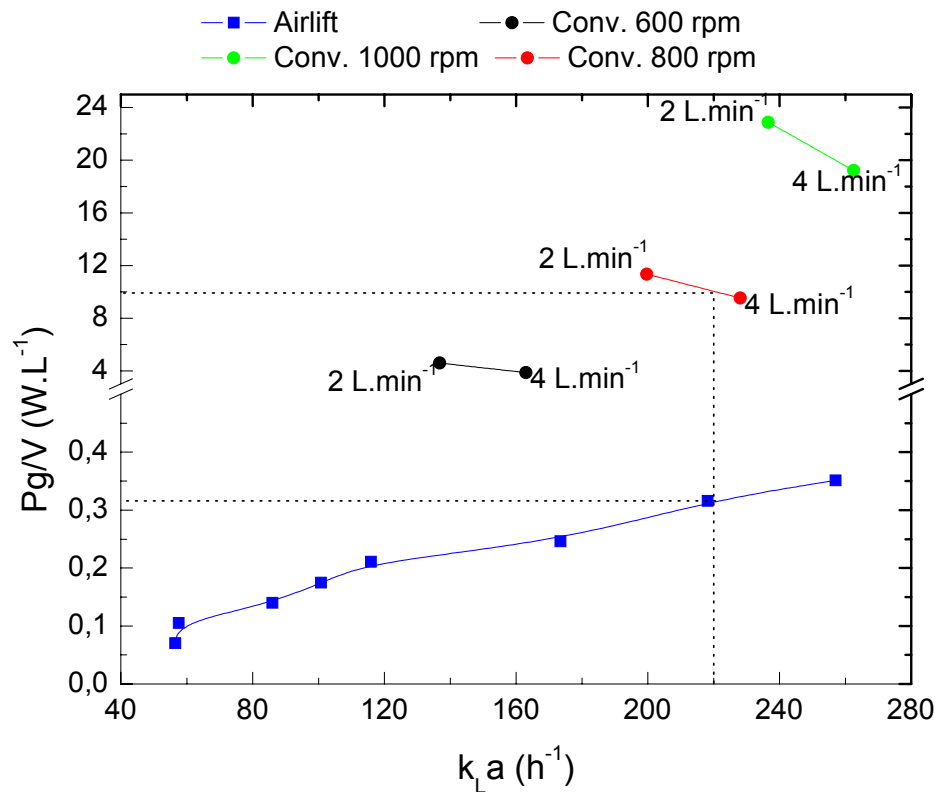


Figura 4-5 – Gráfico do consumo de potência específica de sistema gaseificados em função do  $k_La$ .

Como ilustração, observa-se no gráfico da Figura 4-5 que para um mesmo valor de  $k_La$  de  $220 h^{-1}$ , para o biorreator airlift é necessário apenas  $0,32 W.L^{-1}$  a passo que para o biorreator convencional gasta  $9,0 W.L^{-1}$ . Logo para transferir a mesma quantidade de oxigênio, o biorreator airlift consome 28 vezes menos energia que o biorreator convencional.

#### **4.5 Comparação entre o método dinâmico e o método do sulfito para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ )**

Comparar dois métodos para determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio se faz necessário, pois os métodos determinam  $k_La$  em situações diferentes.

O método do sulfito determina o  $k_La$  em soluções não-coalescentes, dado que a adição de sulfito de sódio e sulfato de cobre forma uma solução iônica. Como resultado, uma vez formadas, as bolhas não se unem formando bolhas maiores, em outras palavras, não coalescem. Tal fato acaba por definir uma alta área interfacial de troca de massa, pois para um mesmo volume de ar a área interfacial aumenta com o número de bolhas.

O método dinâmico determina o  $k_La$  em meio coalescente, já que se utiliza água destilada como fase líquida. As bolhas de ar tendem a se unir, formando bolhas maiores que diminuem a área interfacial de troca de massa.

A Figura 4-6 apresenta ilustrações de sistemas coalescentes e não-coalescentes.

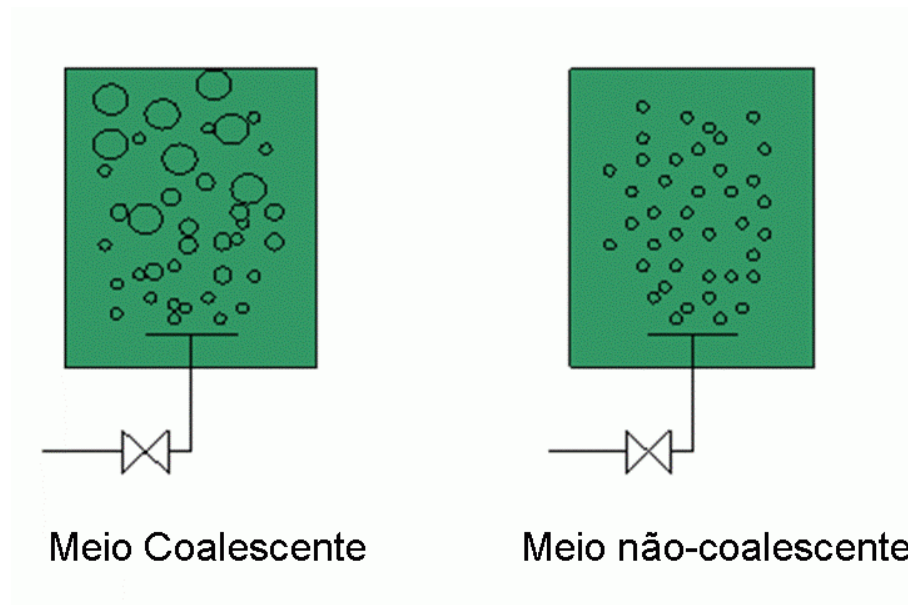


Figura 4-6 Esquema ilustrativo de soluções coalescentes e não-coalescentes.

Caldos de fermentação em geral comportam-se como sistemas coalescentes, logo, para comparar capacidade de transferência de oxigênio de diferentes biorreatores convencionais e pneumáticos é mais apropriado a utilização do método dinâmico. Quando utilizado o método de sulfito de sódio, os valores de  $k_L a$  obtidos para o biorreator convencional apresentam valores bem superiores àqueles obtidos para biorreator airlift (Cassiano Filho, 2003).

A Tabela 4-7 que segue, apresenta valores de  $k_L a$  para o biorreator airlift obtidos em diferentes condições de aeração pelo método dinâmico e o método de sulfito de sódio. Os valores de  $k_L a$  obtidos pelo método de sulfito de sódio foram extraídos da dissertação de Cassiano Filho (2003).

Tabela 4-7 - Resultados de  $k_{L,a}$  para o biorreator airlift pelo método dinâmico e do sulfito.

Vazão de ar (vvm)	Método Dinâmico		Método do Sulfito	
	$k_{L,a}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )	$k_{L,a}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )
1	0,016	56,5	0,036	129,2
1,5	0,016	57,6	0,054	195,2
2	0,024	86,0	0,074	266,0
2,5	0,028	100,8	0,080	288,4
3,0	0,032	115,9	0,095	342,7
3,5	0,048	173,5	0,108	387,4
4,0	-	-	0,120	432,5
4,5	0,061	218,2	0,129	465,2
5,0	0,071	257,0	0,155	559,7

Observando-se os dados experimentais da tabela 4-7, nota-se que o método do sulfito gera valores muito maiores de  $k_{L,a}$  que o método dinâmico que pode ser explicado pela ocorrência de coalescência no sistema ar-água e não coalescência no sistema ar-água-sulfito de sódio.

A Figura 4-7 ilustra a diferença entre valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) obtidos pelo método dinâmico e do sulfito, para o biorreator airlift em diferentes condições de aeração.



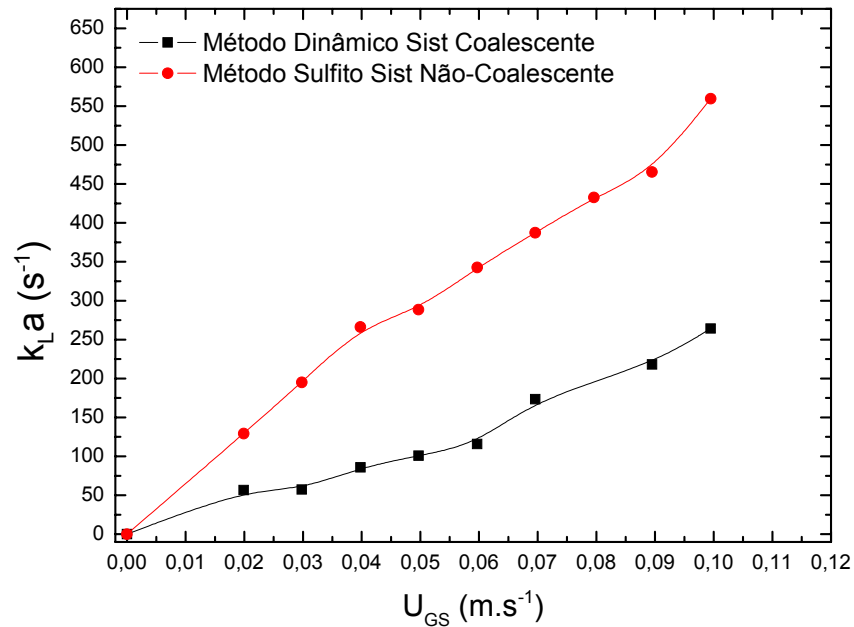


Figura 4-7 Valores de  $k_{La}$  para o biorreator airlift em função da vazão de ar obtidos pelo método dinâmico e de sulfito.

Observa-se que para dada uma vazão específica de alimentação de ar, os valores de  $k_{La}$  obtidos pelo método do sulfito são entre duas e quatro vezes maiores que os obtidos pelo método dinâmico.

A Tabela 4-8 que segue, ilustra valores de  $k_{La}$  para o biorreator convencional obtido em diferentes condições de aeração pelos métodos dinâmico e o do sulfito de sódio. Os valores de  $k_{La}$  obtidos pelo método de sulfito de sódio foram extraídos do trabalho de Vilaça (1997).

Tabela 4-8 - Resultados de  $k_La$  para o biorreator convencional pelo método dinâmico e do sulfito.

Método Dinâmico				Método do Sulfito			
Vazão de ar (L.min <sup>-1</sup> )	Rotação (rpm)	$k_La$ (s <sup>-1</sup> )	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )	Vazão de ar (L.min <sup>-1</sup> )	Rotação (rpm)	$k_La$ (s <sup>-1</sup> )	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )
2,0	600	0,0380	136,8	1,2	500	0,1154	415,6
4,0	600	0,0453	163	1,2	700	0,1517	546,2
2,0	800	0,0555	199,7	1,2	1000	0,1786	642,9
4,0	800	0,0636	228,9	2,4	500	0,1677	603,9
2,0	1000	0,0657	236,6	2,4	700	0,2205	793,9
4,0	1000	0,0729	262,5	2,4	1000	0,3251	1170,5
				4,0	500	0,1918	690,4
				4,0	700	0,3086	1111,1
				4,0	1000	0,4236	1525,0

Na Figura 4-8 ilustra a diferença entre os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio obtido pelo método dinâmico e do sulfito, obtidos para o biorreator convencional em diferentes condições de agitação e aeração.

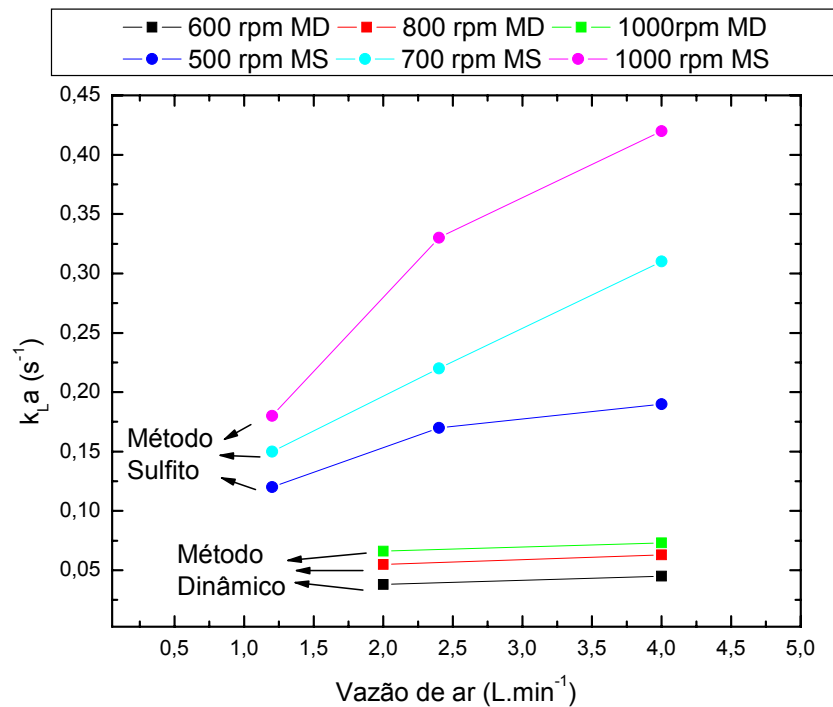


Figura 4-8 - Valores de  $k_La$  para o biorreator convencional em função da vazão de ar obtidos pelo método dinâmico e de sulfito.

Como comparação, para agitação de 1000 rpm e aeração de 4  $L \cdot min^{-1}$ , o valor de  $k_La$  obtido pelo método dinâmico foi cerca de seis vezes menor em comparação aquele obtido pelo método do sulfito.

Ainda, como no biorreator convencional há partes mecânicas fragmentando as bolhas, o que não há no biorreator airlift, a medida que aumenta a frequência de rotação (N), a diferença entre os valores de  $k_La$  entre os métodos se torna cada vez maior.

Conclui-se que o método dinâmico se mostra muito mais representativo para expressar a transferência de oxigênio em cultivos do que o método do sulfito, que superestima os valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) pois geram um meio não coalescente diferente da maioria dos caldos que são coalescentes.

## **4.6 Cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para produção de ácido clavulânico**

Para avaliar o sistema airlift como biorreator, foram realizados quatro cultivos, dois em biorreator convencional (B1 e B2) em diferentes condições de agitação e aeração que apresentam duas condições de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e dois cultivos em biorreator airlift (A1 e A2) sob condições de aeração que definem mesmas condições de transferência de oxigênio alcançadas no biorreator convencional. As duas condições de cultivo que definem os mesmos valores de  $k_{La}$  estão apresentadas na Tabela 4-7.

Tabela 4-9 - Condições de  $k_{La}$  para os cultivos B1, B2, A1 e A2.

Cultivo	$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )	Biorreator convencional		Biorreator airlift
		N (rpm)	$\phi_{ar}$ (vvm)	$\phi_{ar}$ (vvm)
B1	136,8	600	0,5	-
B2	199,7	800	0,5	-
A1	136,8	-	-	3,00
A2	199,7	-	-	4,08

### **4.6.1 Cultivos em Biorreator tipo tanque agitado e aerado**

Os resultados de concentração de ácido clavulânico ( $C_{ac}$ ), concentração de glicerol ( $C_{glic}$ ), índice de consistência (K), índice de

comportamento de escoamento ( $n$ ) e de concentração de oxigênio dissolvido (OD) estão ilustradas em função do tempo de cultivo. Na Figura 4-9 encontram-se os resultados obtidos no cultivo B1 realizado em biorreator convencional a 600 rpm e 0,5 vvm.

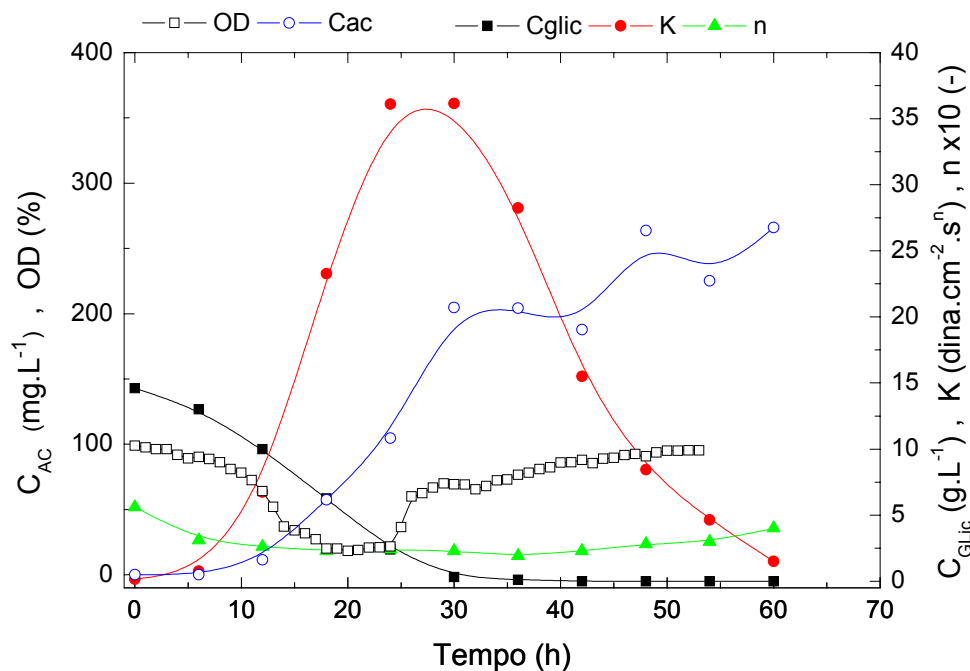


Figura 4-9 Resultados do cultivo B1 em biorreator tipo tanque agitado e aerado a 600 rpm e 0,5 vvm.

A produção máxima de ácido clavulânico (Cac) foi de 263,6 mg.L<sup>-1</sup> em 48 horas.

O segundo cultivo em biorreator tipo tanque agitado (B2) foi realizado nas condições de aeração e agitação de 800 rpm e 0,5 vvm. Na Figura 4-10 apresenta-se os resultados do cultivo B2.

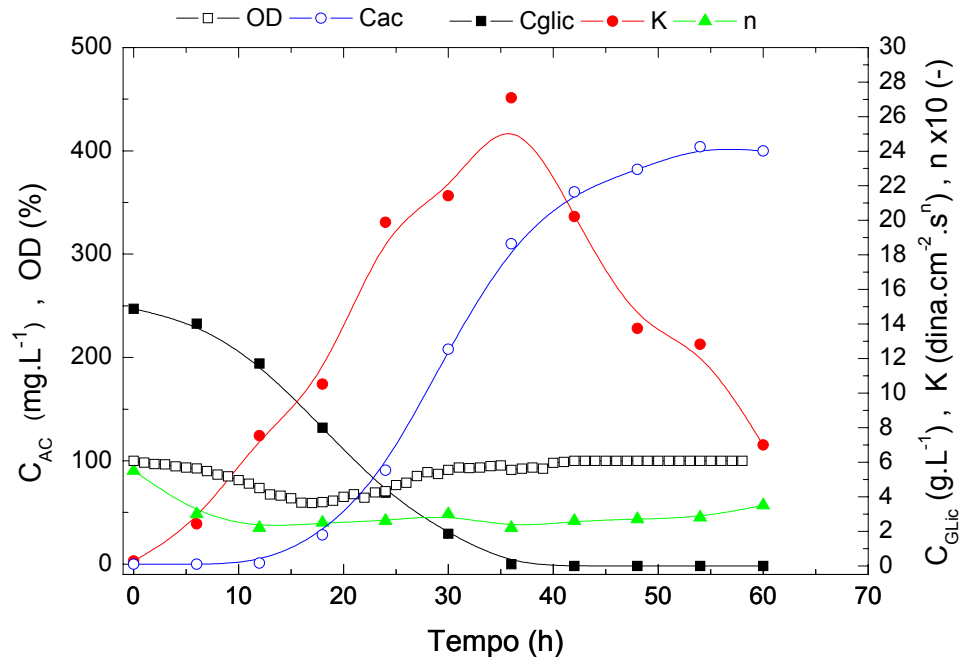


Figura 4-10 Resultados do cultivo B2 em biorreator tipo tanque agitado e aerado a 800 rpm e 0,5 vvm.

Observa-se novamente, que não houve limitação por falta de oxigênio durante o cultivo B2 com oxigênio dissolvido alcançando um valor mínimo de 60 %, em torno de cultivo, sendo este valor muito acima do valor encontrado do cultivo B1. O cultivo alcançou a produção máxima de ácido clavulânico de 404 mg.L<sup>-1</sup> em 54 horas, 53,2 % superior do valor encontrado no cultivo B1, devido provavelmente a maior condição de cisalhamento imposta ao caldo, o que se traduz em maior valor de concentração mínima de oxigênio dissolvido, tal como observado por Rosa *et al.* (2004).

A Figura 4-11 apresenta a comparação entre os cultivos B1 e B2, em termos de concentração de oxigênio dissolvido (OD) e concentração de ácido clavulânico (Cac) e índice de consistência (K).

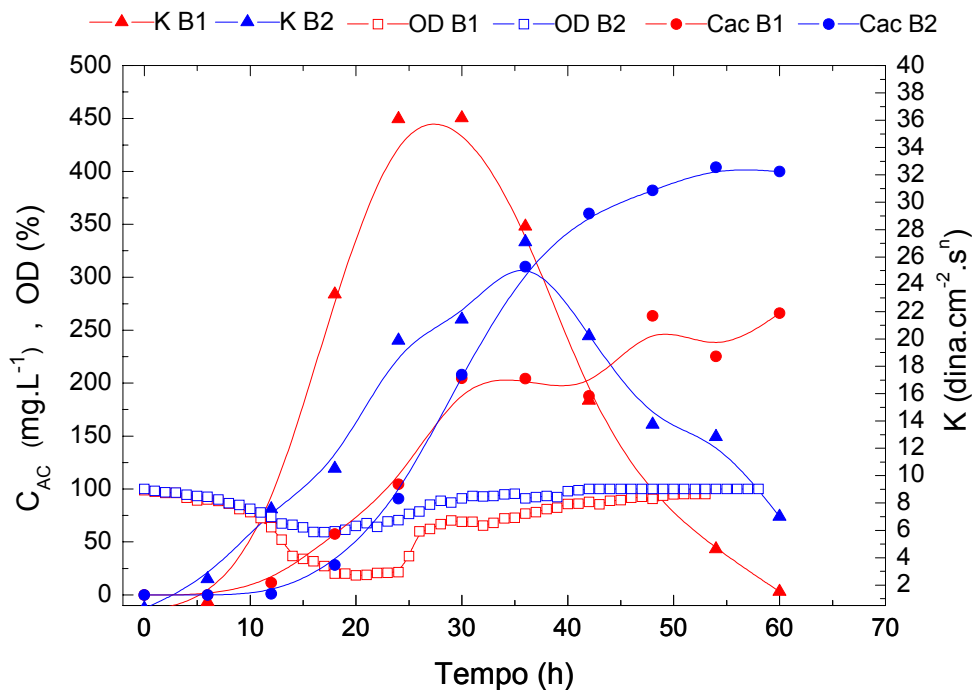


Figura 4-11 – Comparação entre os cultivos B1 e B2, concentração de ácido clavulânico (Cac) e oxigênio dissolvido (%), índice de escoamento (K).

Quanto aos valores do índice de consistência (K), observa-se que em maiores condições de cisalhamento (cultivo B2) o valor máximo encontrado para esse parâmetro foi inferior mesmo tendo alcançado uma produção superior, indicando uma maior produção específica (Cac/K) de ácido clavulânico.

A comparação entre os cultivos B1 e B2 mostra que o cultivo operado em condições de menor  $k_{La}$ , obteve menor concentração de ácido clavulânico (263,6 mg.L<sup>-1</sup>) e o oxigênio dissolvido aproximou-se de

20%, valor baixo em comparação com o cultivo B2, que obteve concentração de  $404 \text{ mg.L}^{-1}$  com menor valor do oxigênio dissolvido em torno de 55%, concluindo que o  $k_{La}$  é um parâmetro muito importante a ser considerado na execução de cultivos.

#### 4.6.2 Cultivos em Biorreator Airlift

O primeiro cultivo em biorreator airlift (A1) foi realizado na condição de aeração de 3 vvm ( $18 \text{ L.min}^{-1}$ ) com pH e temperatura controlados a 6,8 e  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Na figura 4-12 encontram-se os resultados obtidos no cultivo A1, de concentração de ácido clavulânico ( $C_{Ac}$ ), concentração de glicerol ( $C_{Glic}$ ), índices de consistência (K), índice de comportamento de escoamento (n) e oxigênio dissolvido (OD) ao longo do tempo.

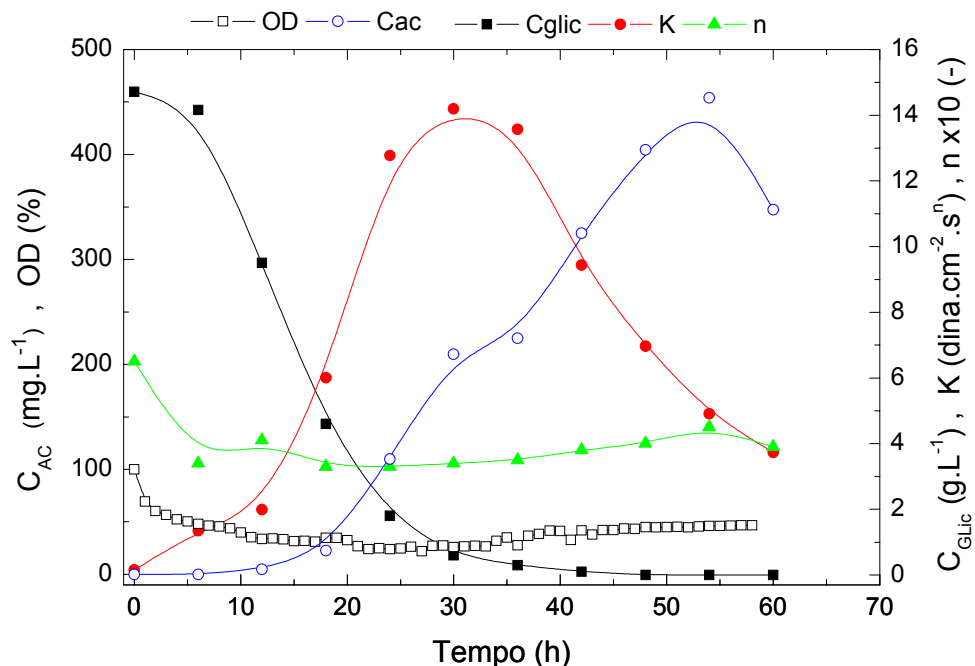


Figura 4-12 - Resultados do cultivo A1 em biorreator Airlift com aeração de 3 vvm.



Observa-se que no cultivo A1 também não houve limitação por falta de oxigênio alcançando um valor mínimo de oxigênio dissolvido de 22%, em 24 horas de cultivo, como ilustrado na figura 4-12. O cultivo alcançou valor máximo de  $K$  em torno de  $14 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ , inferior aos cultivos em biorreator convencional, a produção máxima de ácido clavulânico foi de  $454,3 \text{ mg.L}^{-1}$  em 54 horas, um resultado superior aos encontrados nos cultivos em biorreator convencional.

O segundo cultivo em biorreator airlift (A2) foi realizado com a alimentação de ar de  $4,08 \text{ vvm}$  ( $25,4 \text{ L.min}^{-1}$ ) e ocorreu nas condições de pH e temperatura de  $6,8$  e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Os resultados do cultivo A2 estão ilustrados na Figura 4-13.

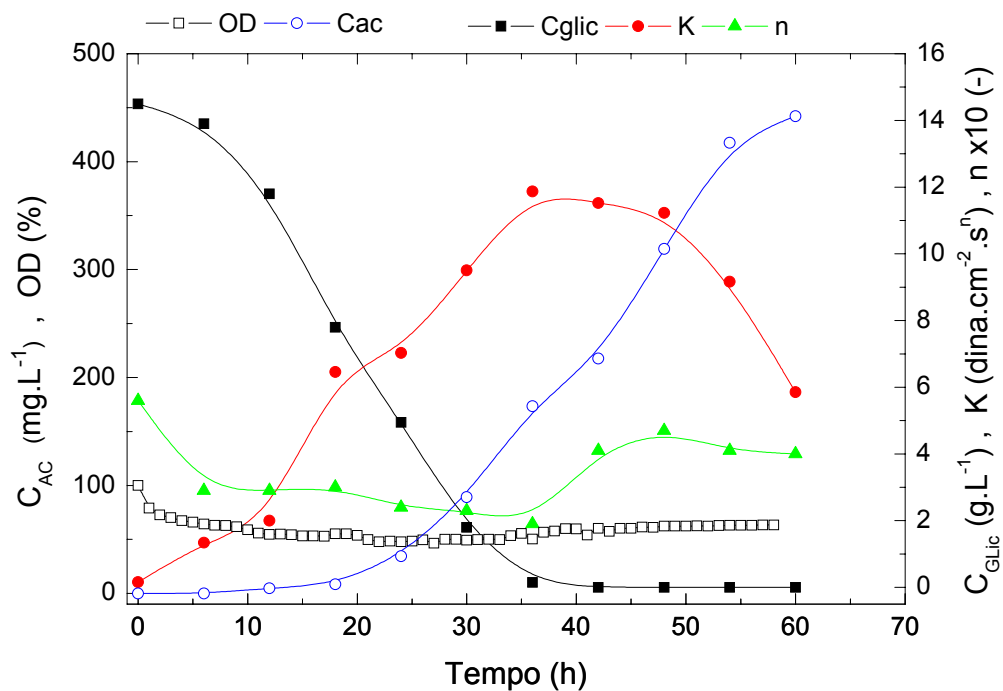


Figura 4-13 - Resultados do cultivo A2 em biorreator Airlift com aeração de  $4,08 \text{ vvm}$ .

Nesse cultivo também não foi observado limitação por falta de oxigênio chegando a concentração de oxigênio dissolvido ao valor de 47%. A produção máxima de ácido clavulânico foi de 442,1 mg. L<sup>-1</sup> em 60 horas de cultivo. Nesse cultivo, a concentração de oxigênio dissolvido não pode ser registrado por problema no cabo do eletrodo de OD. Desta forma, o perfil de OD foi obtido considerando o perfil de OD do cultivo A1 e as condições de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) dos dois cultivos, supondo o mesmo perfil de velocidade global de respiração celular.

A Figura 4-14 apresenta a comparação entre os cultivos A1 e A2, em termos de concentração de oxigênio dissolvido (OD) e concentração de ácido clavulânico (Cac) e índice de consistência (K).

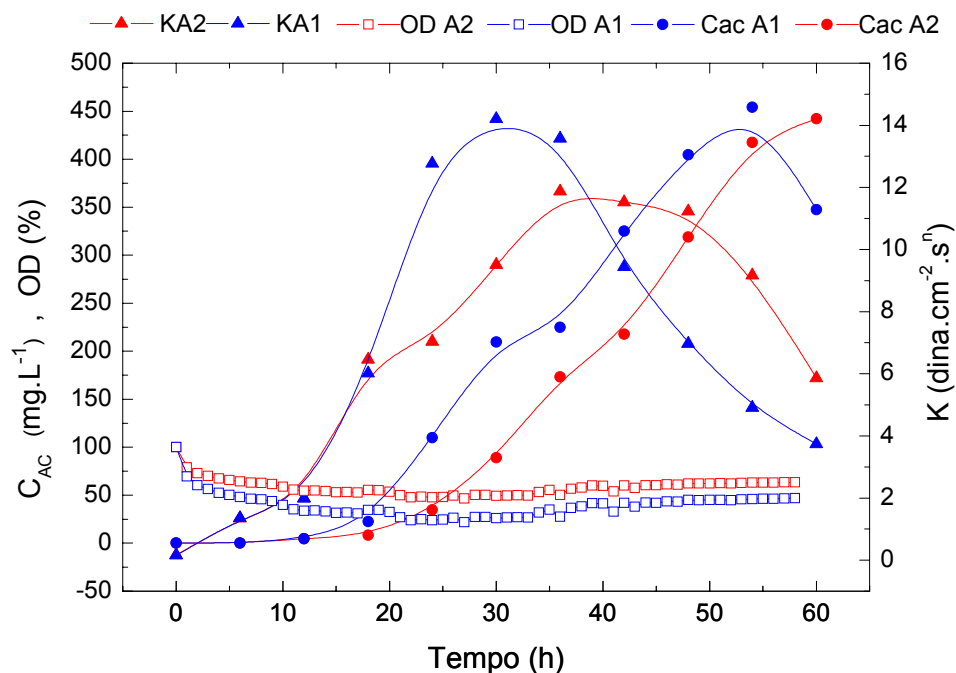


Figura 4-14 – Comparação entre os cultivos A1 e A2, concentração de ácido clavulânico (Cac) oxigênio dissolvido (%) e índice de consistência (K).

Observa-se que nesses cultivos, as predições de AC foram similares e superiores à obtida no cultivo B2 e com valores máximos de K bem inferiores, repetindo os resultados de alta produção específica de AC (Cac/K).

#### **4.6.3 Comparações entre cultivos em diferentes Biorreatores**

Na seqüência serão apresentadas comparações entre os cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico nos diferentes biorreatores empregados em diferentes condições de operação, destacadas abaixo:

- Cultivo B1 : Biorreator tipo tanque agitado a 600 rpm e 0,5 vvm.
- Cultivo B2: Biorreator tipo tanque agitado a 800 rpm e 0,5 vvm.
- Cultivo A1: Biorreator Airlift aerado com 3 vvm.
- Cultivo A2: Biorreator Airlift aerado com 4,08 vvm.

Na figura 4-15 são apresentados os perfis do parâmetro reológico índice de consistência (K), concentração de ácido clavulânico (Cac) e oxigênio dissolvido (OD) para os cultivos realizados no biorreatores airlift (A1) e convencional agitado (B1), operados em condições que definem o mesmo valor de  $k_L a$  de  $137 \text{ h}^{-1}$ .

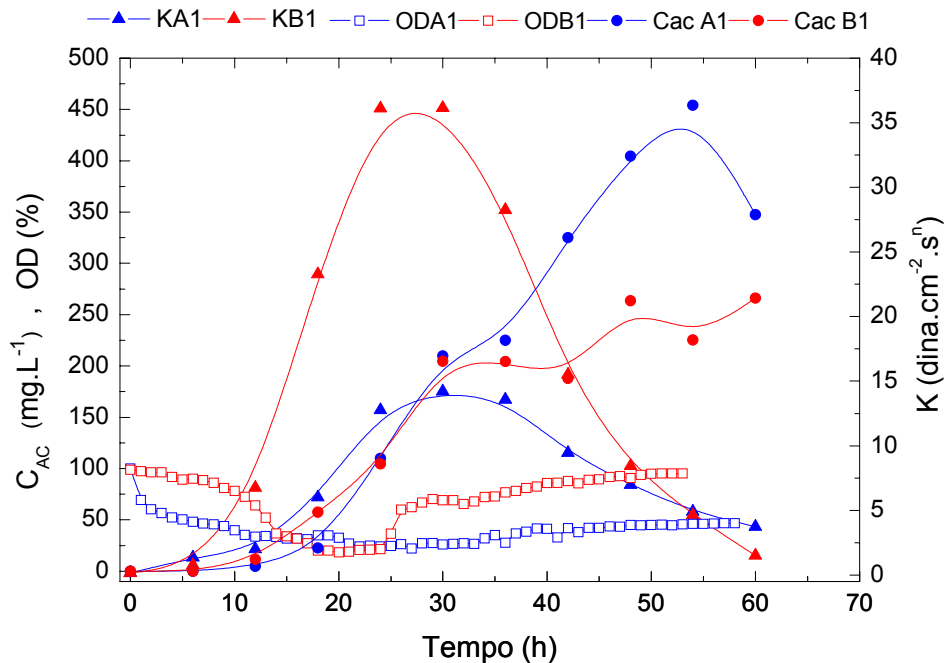


Figura 4-15 Comparação dos cultivos A1 e B1, com a produção de ácido clavulânico (Cac), índice de consistência (K) e oxigênio dissolvido (OD).

Observa-se que no cultivo A1 atingiu-se uma alta concentração de ácido clavulânico com índice de consistência relativamente baixo, comparado com o cultivo B1, que atingiu um alto valor de K e não obteve uma alta concentração de ácido clavulânico.

O índice de consistência (K) é uma variável de processo relacionada à concentração e morfologia celular, em outras palavras, numa mesma condição de cisalhamento, quanto maior o K maior a concentração celular.

Portanto, no cultivo A1, sendo o consumo de glicerol similar, os microrganismos foram mais cisalhados ( $K_{\text{máx}} = 14,3 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ ) e se produziu mais ácido clavulânico ( $Cac_{\text{máx}} = 454,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) enquanto no cultivo B1 os microrganismos foram menos cisalhados devido à menor

freqüência de rotação ( $K_{m\acute{a}x} = 36,1 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ ) e, comparativamente, pouco ácido clavulânico foi produzido ( $C_{ac,m\acute{a}x} = 263,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Quanto aos valores de oxigênio dissolvido, pode-se notar que para o cultivo B1, após a fase de alto consumo de oxigênio (de 0 a 24 horas), houve uma retomada para um patamar elevado de concentração de oxigênio dissolvido. Já para o cultivo A1 os valores de oxigênio dissolvido após um decréscimo acentuado, não apresentaram uma retomada perceptível, mantendo-se num patamar constante e inferior.

Na Figura 4-16 são apresentados perfis do parâmetro reológico índice de consistência (K), concentração de ácido clavulânico (Cac) e concentração de OD para os cultivos A2 e B2, realizados nas mesmas condições de  $k_{La}$  ( $199,7 \text{ h}^{-1}$ ) em diferentes tipos de biorreatores.

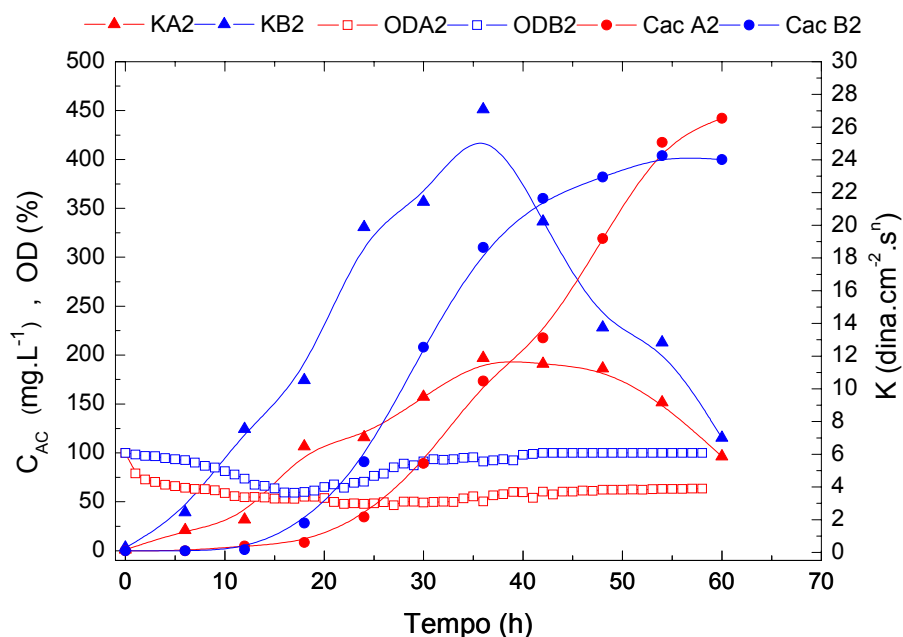


Figura 4-16 Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cac), índice de consistência (K) e concentração de OD para os cultivos A2 e B2.

Observa-se que no cultivo A2 foi atingida uma alta concentração de ácido clavulânico com índice de consistência relativamente baixo, comparado com o cultivo B2, que atingiu um alto valor de K obtendo-se também uma alta concentração de ácido clavulânico.

Conhecendo-se os consumos de glicerol que foram similares, mais a influência do cisalhamento traduzido no valor de K máximo (11,9 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>). É provável que tal condição tenha sido a responsável pela alta concentração de ácido clavulânico ( $C_{ac_{máx}} = 442,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Já no cultivo B2 observa-se um maior valor de K máximo (27,1 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>) e uma menor concentração máxima de ácido clavulânico ( $C_{ac_{máx}} = 404 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o que mais uma vez sugere que a maior produção de ácido clavulânico está relacionada com altas condições de cisalhamento.

Quanto aos valores de concentração de oxigênio dissolvido presentes na Figura 4-16, pode-se notar que para o cultivo B2, após a fase de alto consumo de oxigênio (de 0 a 24 horas), houve uma retomada para um patamar elevado de concentração de oxigênio dissolvido. Já no cultivo A2, os valores de concentração de oxigênio dissolvido após um decréscimo acentuado, apresentaram uma retomada perceptível, mantendo-se em um patamar constante, no entanto menor que do cultivo B2.

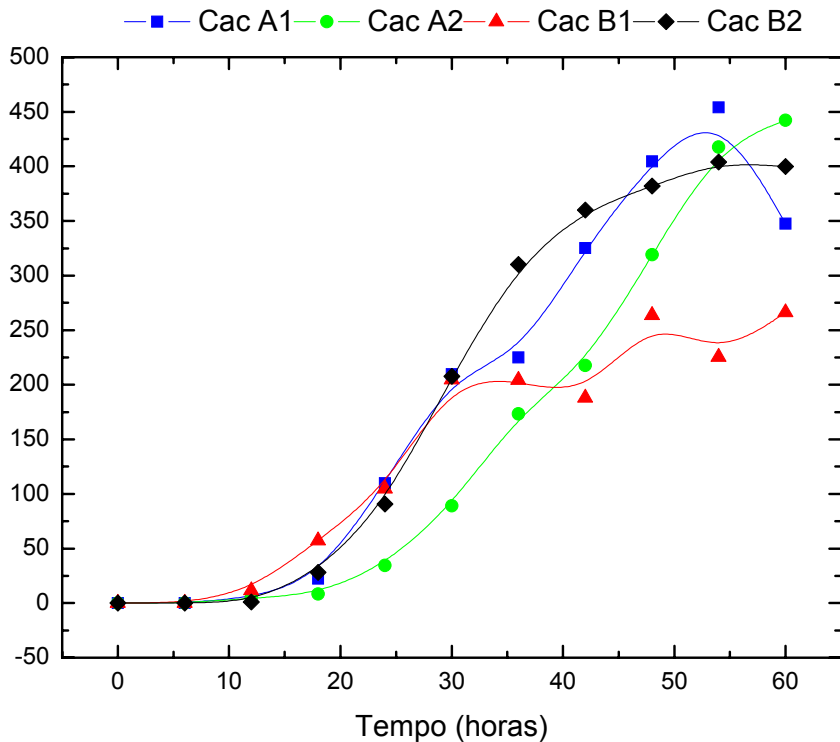


Figura 4-17 Valores de produção de ácido clavulânico para os cultivos A1, B1, B2 e A2.

Na Figura 4-17 onde estão ilustrados os perfis de concentração de ácido clavulânico para todos os cultivos, observa-se que aquele que apresentou maior concentração de ácido clavulânico foi o A1 ( $Cac_{m\acute{a}x} = 454,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mostrando que o biorreator airlift se compara e até supera o desempenho do biorreator convencional, apresentando algumas vantagens como o menor consumo de energia.

#### 4.6.4 Condições de cisalhamento empregadas nos cultivos

Para os cultivos realizados em biorreator airlift, os valores máximos alcançados do índice de consistência do caldos ( $K_{m\acute{a}x}$ ) apresentaram-se muito menores que aqueles dos cultivos realizados em biorreator

convencional. Parece, portanto, que as condições de cisalhamento no biorreator airlift foram maiores.

É possível calcular valores de velocidade média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) para as diferentes condições de operação empregadas nos biorreatores estudados, a partir de correlações propostas na literatura. Metzner *et al.* (1961) propuseram a seguinte correlação estimar a velocidade média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) entre a extremidade do impelidor e a parede do tanque em sistemas com dois impelidores tipo turbina de 6 pás planas.

$$\dot{\gamma}_{m-BC} = 11,4 \cdot N \quad \text{Eq. 4-6}$$

Para o cálculo das condições de cisalhamento no biorreator airlift empregado no presente trabalho, pode-se empregar a correlação de Nishikawa *et al.* (1977), originalmente proposta para biorreatores coluna de bolhas e airlift de circulação externa, dada como segue:

$$\dot{\gamma}_{m-AL} = 5000 \cdot U_{GS} \quad \text{Eq. 4-7}$$

$$U_{GS} = \frac{\dot{V}_{ar}}{A_S} \quad \text{Eq. 4-8}$$

Onde:

$\dot{V}_{ar}$  : vazão de alimentação de ar ( $m^3 \cdot s^{-1}$ ).

$A_S$  : área superficial da região de subida de líquido ( $m^2$ ).

$U_{GS}$ : velocidade superficial do gás na região de subida ( $m \cdot s^{-1}$ )



A tabela que segue ilustra os valores de  $\dot{\gamma}_m$  em que os cultivos foram realizados.

Tabela 4-10 – Valores de  $\dot{\gamma}_m$  nos diferentes tipos de biorreatores nas condições de cultivo empregadas

Biorreator Convencional				Biorreator Airlift		
N (s <sup>-1</sup> )	$\phi_{ar}$ (vvm)	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )	$\dot{\gamma}_m$ (s <sup>-1</sup> )	$\phi_{ar}$ (vvm)	$k_La$ (h <sup>-1</sup> )	$\dot{\gamma}_m$ (s <sup>-1</sup> )
10,00	0,5	136,8	114,0	3,00	136,8	300,0
13,33	0,5	199,7	152,0	4,08	199,7	406,1

Os resultados da Tabela 4-10 mostram que os valores de  $\dot{\gamma}_m$  nos cultivos realizados em biorreator airlift foram muito superiores aos valores de  $\dot{\gamma}_m$  relacionados ao biorreator convencional nas mesmas condições de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), o que corrobora com os baixos valores de índice de consistência máximo ( $K_{max}$ ) obtidos nos cultivos, que são ilustrados na Figura 4-18, a relação do  $K_{max}$  em função da velocidade de cisalhamento.

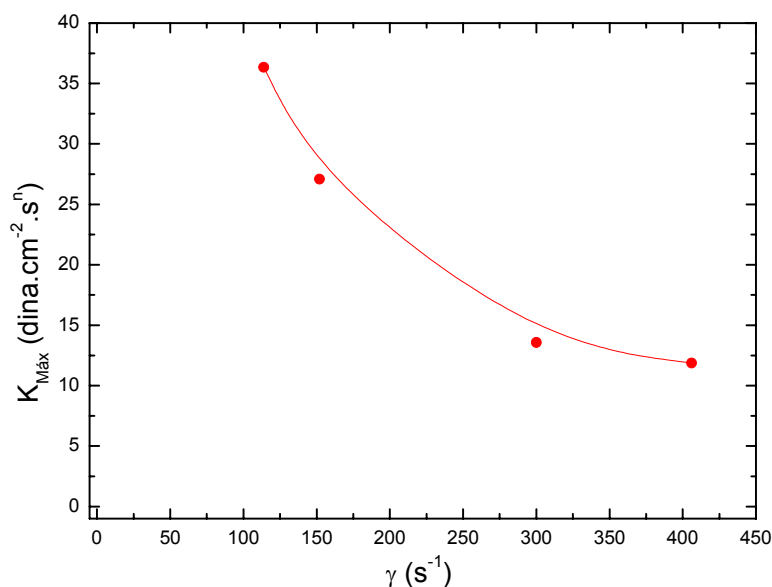


Figura 4-18 Gráfico do índice de consistência máxima em função da velocidade de cisalhamento.

No presente trabalho mais uma vez se prova, agora para biorreator não convencional, que a produção de ácido clavulânico é afetada positivamente por altas condições de cisalhamento, tal como observado no trabalho de Rosa *et al.* (2005).

Para ilustrar como o aumento da velocidade de cisalhamento aumenta a produção de ácido clavulânico é apresentado na Figura 4-19 valores de produção de ácido clavulânico máxima em função da velocidade de cisalhamento.

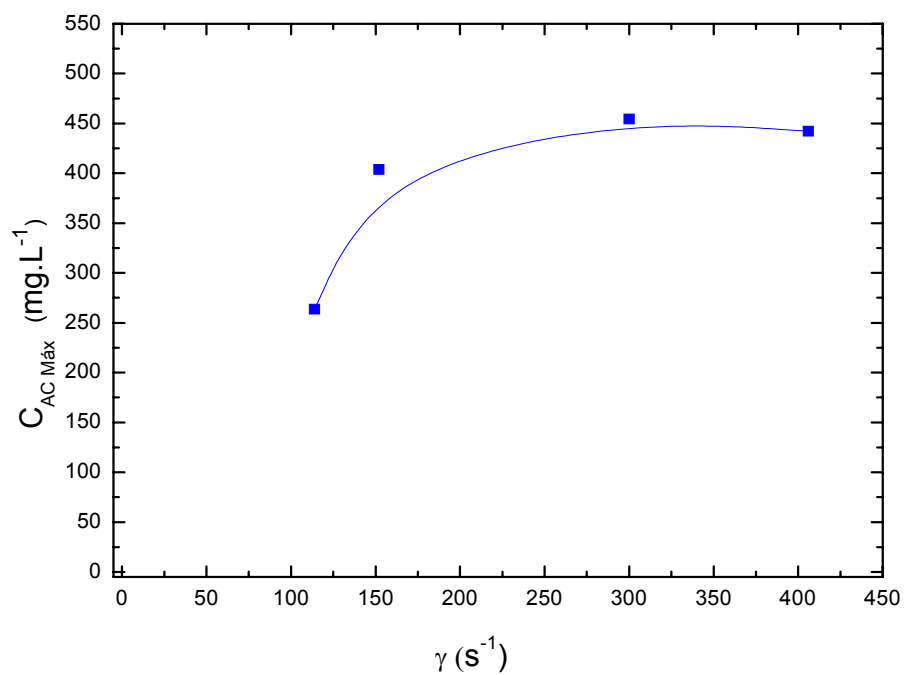


Figura 4-19 Gráfico de produção de ácido clavulânico máximo em função da velocidade de cisalhamento.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho de dissertação foi dividido em quatro etapas: determinação do coeficiente global de transferência de calor no biorreator airlift, avaliação do arraste de água do sistema biorreator mais condensador, avaliação e comparação da transferência de oxigênio em biorreatores airlift e convencional e cultivos em biorreatores airlift e convencional de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico.

Quanto à avaliação da transferência de calor no sistema, valores obtidos para o coeficiente global de troca de calor (U) apresentaram valores satisfatórios para uma biorreator que não opera com altas nem rápidas variações de temperatura. Os valores ficaram dentro da faixa conhecida da literatura, mostrando que o novo dispositivo proposto para controle de temperatura foi muito eficiente ao longo dos cultivos realizados.

O coeficiente global de troca térmica (U) pôde ser relacionado adequadamente com variáveis do sistema como a vazão de ar, a vazão de água do tubo interno e a vazão de água para resfriamento por uma correlação, a partir da qual foi possível visualizar as influências individuais de cada uma das variáveis na transferência de calor, sendo a vazão específica de água no interior do tubo interno oco a variável que mais influenciou nos valores de U.

Quanto à avaliação da eficiência do condensador, conclui-se que o mesmo se mostrou eficiente, mas não solucionou totalmente o problema de perda de água do sistema por arraste pelos altos fluxos de ar que passam pelo biorreator airlift. A eficiência chegou a valores superiores a 80%, mostrando a importância do uso do condensador no biorreator.

Os resultados de  $k_La$  deixaram evidente a diferença entre dois métodos de determinação de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), quais sejam, método dinâmico e método do sulfito, comprovando que em sistemas não-coalescentes (água-sulfito de sódio) a transferência de oxigênio é muito superior que em sistemas coalescentes (água). Valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), obtidos no biorreator airlift e no biorreator convencional (Bioflo III) pelo método dinâmico considerando o atraso do eletrodo, apresentaram valores similares nas faixas de variáveis estudadas, mostrando ser esse método o mais adequado para comparar desempenhos de biorreatores quanto à transferência de oxigênio.

Em mesmas condições de transferência de oxigênio ( $k_La$ ), o biorreator airlift apresentou consumos de energia muito inferiores que aqueles obtidos em biorreator convencional.

Os cultivos realizados em biorreatores airlift e convencional para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* nas duas diferentes condições de transferência de oxigênio testadas, comprovaram que maiores produções foram obtidas nos cultivos realizados em biorreator airlift, com valores máximos de K bem inferiores, resultando em

altas produções específicas de AC ( $C_{ac}/K$ ). Os baixos valores do índice de consistência máximo ( $K_{max}$ ) encontrados nos cultivos concordaram com as condições de cisalhamento impostas aos caldos, quantificadas por correlações de literatura entre a velocidade média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) e as condições de agitação e aeração, mostrando que o aumento da velocidade de cisalhamento contribui positivamente para a produção de ácido clavulânico como mostrado no estudo de Rosa *et. al* (2005).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aiba, S.; Humphrey, A. E; Millis, N. F.; Biochemical engineering, 2 ed, Tóquio, University of Tokio Press, 1973.

Aleksieva, P.; Peeva, L.; Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in na airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 26, pp- 402-405 2000

Asenjo. J. A.; Merchuk; J. C. *Bioreactor System Design*, Marcel Dekker, Inc. 1994.

Badino A.C.; Hokka C.O.; Cerri M.O. Patente n. PI0404703-6 Biorreator Pneumático de Circulação Interna e Uso do Mesmo, 2004.

Badino Jr., A. C. Reologia consumo de potência e de transferência de oxigênio em cultivos descontínuos *Aspergillus awamori* NRRL 312. São Paulo, SP, USP, 1997, Tese.

Bailey, J. E.; Ollis, D.F.; *Biochemical Engineering*, New York, MCGraw Hill, 1986.

Baptista Neto, A.; Estudos Cinéticos e Reológicos do Processo Descontínuo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, São Carlos-SP, 2000 [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos ].

Baptista-Neto, A.; Gouveia, E.R.; Hokka, C.O.; Badino-Jr, A.C.; Influência da concentração de glicerol na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, XIII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2000.

Barboza, M., Zaiat, M., Hokka, C. O.; General relationship for volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ) prediction in tower bioreactors utilizing immobilized cells: *Bioprocess Engineering* 22, p. 181-184, 2000.

Bates, R. L.; Fondy, P.L. Corpstein, R.R. An examination of some geometric parameters of impeller power. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v.2, n. 4, p. 310-314, 1963.

Belmar-Beiny, M.T.; Thomas, C.R.; Morphology and Clavulanic Acid Production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of Stirrer Speed in Batch Fermentations, *Biotech., Bioeng.*, 37, p.456-462, 1991.

Bersanetti, P.A., Barbosa, M., Hokka, C.O., Araújo, M.L.G.C.; Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico, XIII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2000.

Bird, A.E., Bellis, J. M., Basson, B.C. (1982) Spectrophotometric assay of clavulânico acid by reaction with imidazole, *Analist*, v. 107, p. 1241-1245.

Brown, A.G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hanscomb, G.; Hood, J.D.; Reading, C.; Rolinson, G.N; Naturally Occurring  $\beta$ -lactamase-inhibitors With Antibacterial Activity, *J. Antibiot.*, v.29, p.668-669, (1981).

Butterworth, D.; *Clavulanic Acid: Properties in Biosynthesis and Fermentation*, *Biotechnology of Industry of Antibiotics*, edited by E.J. Vandamme, New York, by Marcel Dekker, Inc., p.3-31, 1984.

Cassiano Filho, L. C. M.; Avaliação do desempenho de biorreator airlift para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, São Carlos-SP, 2003 [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos ].

Chen, K. C.; Lin, Y. H.; Hwang, S. C. J.; Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 152-156, 2003.

Chisti M. Y.; Fujimoto, K.; Moo-Young, M.; Hidrodinamic and oxygen mass transfer Studies in bubble columns and airlift bioreactors, paper 117a presented at the A.I.Ch.E Annual Meeting, Miami Beach, 2-7 november, p. 72-81, 1986.

Chisti, Y.; Airlift bioreactors. Belfast, Northern Ireland, Elsevier Science Publishers Ltd. 1989a.

Chisti, Y.; Airlift reactors – desing and diversity. *The Chemical Engineer*, February, 1989b.

Domingues, L.; Lima, N.; Teixeira, J. A.; Alcohol Production from Cheese Whey Permeate Using Genetically Modified Flocculent Yeast Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 72, No. 5, pp. 507-514 2001.

Fields, P.R.; Slater, N. K. H.; Tracer dispersion in a laboratory air-lift reactor, *Chemical Engineering Science*, v. 38, número 4, p. 647-653, 1983.

Gavrilescu, M.; Roman, R. V.; Performance of Airlift Bioreactors in the Cultivation of Some Antibiotic Producing Microorganisms. *Acta Biotechnol.* 18, pp. 201-209 1998a.

Gavrilescu, M.; Tudose, R.Z.; Modelling of liquid circulation velocity in concentric-tube in airlift reactors, *Chemical Engineering Journal*, v. 69, p. 85-91, 1998b.

Gouveia, E. R.; Hokka, C. O.; Badino-Jr., A. C., The effects of geometry and operational conditions on gás holdup, liquid circulation and mass transfer in na airlift reactor, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 20, n. 04, p. 363-374, 2003.

Gouveia, E.R.; Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, São Carlos-SP, 2000, [Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos].

Haginaka, J.; Nakagawa, T.; Uno, T.; Stability of Clavulanic Acid in aqueous solutions, *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, p. 3334-3341, 1981.

Heijnen J.J.; Hols, J.; Vanders Lans R. J. G. M.; Vanleeuwen H. L. J. M.; Mulder, A.; Weltevrede, R; A simple hydrodinamic model for the liquid circulation velocity in a full-scale two and three-phase internal airlift reactor operating in the gás recirculation regime, 1997.

Holman, J. P., *Transferência de Calor*; McGraw-Hill; São Paulo; 1983

Ichi, T.; Takehara, S. et al.; Development of a New Commercial-Scale Airlift Fermentor for Rapid Growth of Yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 75, No. 5, pp. 375-379 1993.

Jia, S.; Chen, G.; Kahar, P.; Choi, D. B.; Okabe, M.; Effect of Soybean oil on oxygen transfer in the production of tetracycline with an airlift bioreactor, v. 87, número 6, p. 825-827, 1999.



Lebrihi, A.; Germain, P.; Lefebvre, G.; Phosphate Repression of Cephamicin and Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microb. Biotech.*, v.26, p.130-135, 1987.

Lee, P.C.; Ho, C.C.; Production of Clavulanic Acid and Cephamicin C by *Streptomyces clavuligerus* in Palm-oil Medium, *World J. Microb. Biotech.*, v.12, p.73-75, 1996.

Mayer, A. F.; Deckwer, W.D.; Simultaneous Production and Decomposition of Clavulanic Acid During *Streptomyces clavuligerus* Cultivations, *Appl. Microb. Biotech.*, v.45, p.41-46, 1996.

Metzner, A.B.; Otto, R. E. Agitation of Non-Newtonian fluids. *A.I.Ch.E.J.*, v.3 n.1, p3-10, 1957.

Nishikawa, M. Kato H, Hasimoto, K. Heat transfer in aerated tower filled with Non-Newtonian liquid, *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Devel.* V.16 p. 133-137, 1977.

Onken, U.; Weiland, P. Airlift Fermenters: Construction, Behavior, and Uses; *Advances in Biotechnological Processes* 1, p. 67-95 1983.

Oyama, Y, Endoh, K. Power characteristics of gas-liquid contacting mixer. *Chem Eng.*, v.19, p.2-11, 1955.

Pinto, L. S.; Vieira, L.M.; Pons, M. N.; Fonseca, M.M.R.; Menezes, J. C.; Monitorização de Processo Biológicos: Análise digital de imagem, *Boletim de Biotecnologia*, 2002.

Prakash, A, Margaritis, A., Li, A, Bergougnou, M. A.; Hydrodynamics and local heat transfer measurements in a bubble column with suspension of yeast; *Biochemical Engineering Journal*, v. 9; p. 155–163. 2001.

Romero, J.; Liras, P.; Martín, J.F.; Dissociation of Cephamicin and Clavulanic Acid Biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microb. Biotech.*, v.20, p.318-325, 1984.

Rosa, J. C.; Influência das Condições de Transferência de Oxigênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, São Carlos-SP, 2002 [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos ].

Rosa, J.C.; Baptista-Neto, A.; Hokka, C.O.; Badino, A.C. (2005) Influence of Dissolved Oxygen and Shear Conditions on Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess And Biosystems Engineering* (in press).

Rushton, J.H.; Costich, E.W.; Everett, H.J. (1950a) Power characteristics of mixing impellers- Part I. *Chem. Eng. Progr.* V. 46, n. 8, p. 395-404.

Rushton, J.H.; Costich, E.W.; Everett, H.J. (1950b) Power characteristics of mixing impellers- Part II. *Chem. Eng. Progr.* V. 46, n. 9, p. 467-476.

Sánchez, M. J.; Aparício, A. J.; López, G. G.; Tapia, G. T.; Monroy, M. R.; Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in na air lift bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, v. 12, p. 37-41, 2002.

Schügerl, K.; *Bioreaction Engineering – Volume 2: Characteristic Features of Bioreactors.* John Wiley & Sons, 1987.

Shuler, M.L. and Kargi, F., Bioprocess engineering: basic concepts, Simon & Schuster Company, New Jersey, 1992.

Townsend, C. A.; New reactions in clavulanic acid biosynthesis, *Current Opinion in Chemical Biology*; v. 6, p.583-589, 2002.

Vandamme, E.J.; Antibiotic Search and Production: an Overview, *Biotech. of Ind. Antib.*, edited by E.J. Vandamme, New York, by Marcel Dekker, Inc., p.3-31, 1984.

Vilaça, P.R. Caracterização e operação de diferentes biorreatores para produção de glicocamilase por *Aspergillus awamori*. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia (USP-IPT-I. Butantan), 163 p., 1997.

Yegneswaran, P.K.; Gray, M.R.; Thompson, B.G.; Experimental Simulation of Dissolved Oxygen Fluctuations in Large Fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*, *Biotech. Bio.*, v.38, p. 1203-1209, 1991.

Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xialong, C.; Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor, v. 35, p. 237-242, 1999.

## REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

1 (<http://www.infomed.hpg2.ig.com.br/penicilinas.html>), Autores: Andréa Alves de Azevedo, Márcio Alexandre Pena Pereira, Milhem Jameledien Morais Kansaon, Paulo Sérvulo da Cunha, Patrícia Alves Valadares, Renata Cristina Carvalho Vilela, Renata Eliane de Ávila, Rhaine Matos Gonçalves, Ricardo Alexandre Bayão Santos  
Último Acesso 16/09/2003

2 (<http://classweb.gmu.edu/achriste/385-Ch16ppt/sld016.htm>),  
Último acesso 13/11/2003