

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM
BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA E *AIRLIFT* VISANDO À
PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus oryzae*

Fernando Henrique Stuani

Caxias do Sul, 2015

Fernando Henrique Stuani

**AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM
BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA E *AIRLIFT* VISANDO À
PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Aspergillus oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi

Caxias do Sul, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S929a	Stuani, Fernando Henrique, 1987- Avaliação da transferência de oxigênio em biorreatores de agitação mecânica e airlift visando à produção de pectinases por <i>Aspergillus oryzae</i> / Fernando Henrique Stuani. – 2015. 117 f. : il. ; 30 cm Apresenta bibliografia. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2015. Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira ; coorientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi. 1. Biorreatores. 2. Pectinase. 3. <i>Aspergillus</i> . 4. Microorganismos. I. Título. CDU 2. ed.: 602.42-7
-------	---

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biorreatores	602.42-7
2. Pectinase	577.152.34
3. <i>Aspergillus</i>	582.282.123.4
4. Microorganismos	579.6

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

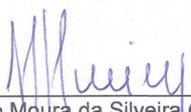
“AVALIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATORES DE AGITAÇÃO
MECÂNICA E AIRLIFT VISANDO À PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *ASPERGILLUS*
ORYZAE”

Fernando Henrique Stuani

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 16 dezembro de 2015.

Banca Examinadora:



Dr. Maurício Moura da Silveira (Orientador)
Universidade de Caxias do Sul



Dra. Eloane Malvessi (Coorientadora)
Universidade de Caxias do Sul



Dra. Aline Dettmer
Universidade de Caxias do Sul



Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Universidade de Caxias do Sul



Dra. Lisete Cristine Scienza
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida e por proporcionar sonhos a serem almejados.

A minha família, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, que sempre estão junto comigo e que jamais medem esforços para me apoiar nos mais variados momentos da minha vida.

À equipe CCAA Flores da Cunha, em especial à Adriana Boeira Dotti, que, apesar de não fazer parte dessa área de minha formação, sempre me aconselha e continua acreditando em meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Mauricio Moura da Silveira, por me guiar pelo caminho da elaboração desse trabalho e por facilitar a compreensão do que é ser um engenheiro químico.

A minha co-orientadora, Eloane Malvessi, pelo enorme conhecimento e dedicação transmitidos.

A minha “colega de sala”, Sabrina Carra, pela amizade e por todo apoio dado, principalmente na fase final do meu Mestrado.

A minha colega de profissão e mestre, Paloma Fontanari Forest, pela troca de experiências, pela amizade desde a graduação, e pelas conversas nos intervalos de almoço.

Às bolsistas de iniciação científica, Marina Ferrari, Katherine Pedron e Gabrielle Paganin, pela dedicação na realização de grande parte dos ensaios analíticos.

Às colegas de projeto, Caroline Reginatto e Lenara Meneghel Santa Catharina, pela troca de experiências e por ajudarem na compreensão dos bioprocessos em que trabalhamos juntos, desde a iniciação científica.

Às “vizinhas de laboratório”, Fernanda Bettin e Gina Gabriela Seabra Cunha, por compartilhar os bons e maus momentos de manuseio do *airlift*, e também por dividir conhecimentos, mesmo trabalhando em bioprocessos com microrganismos distintos.

Ao Laboratório de Bioprocessos (LBIO) da Universidade de Caxias do Sul, por disponibilizar o espaço físico para a realização dessa dissertação.

À Universidade de Caxias do Sul, pela infraestrutura cedida para a realização deste trabalho.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa caminhada.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE QUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE SIGLAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	4
3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS PÉCTICAS	4
3.3 DEGRADAÇÃO DA PECTINA.....	6
3.4 BIORREADORES E PROCESSOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	6
3.4.1 Biorreatores para processos submersos de produção enzimática	7
3.4.1.1 Biorreatores de agitação mecânica.....	7
3.4.1.2 Biorreatores de agitação pneumática.....	9
3.4.2 Parâmetros de processo que influenciam a produção de pectinases	12
3.4.2.1 Reologia.....	12
3.4.2.2 Suprimento e demanda de oxigênio	12
3.4.2.3 Agitação e aeração	14
3.5 ASPERSORES DE GÁS.....	14
3.6 IMPELIDORES E CORRENTES DE FLUXO.....	16
3.6.1 Classificação dos impelidores	18
3.6.1.1 Impelidores Rushton.....	18
3.6.1.2 Impelidores <i>pitched blade</i>	19
3.6.2 Velocidade na extremidade do impelidor	20
3.7 TRANSPORTE DE OXIGÊNIO EM BIORREADORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA.....	21
3.7.1 Potência requerida por fluidos Newtonianos sem aeração	21
3.7.2 Potência requerida por fluidos Newtonianos sob aeração	23
3.7.3 Modelagem empírica para determinação do suprimento de oxigênio em biorreatores sob aeração e agitação mecânica	25

4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MICROORGANISMO E MEIOS DE CULTIVO	30
4.2	PREPARO DE INÓCULO	30
4.3	DETALHAMENTO DOS BIORREADORES	31
4.3.1	Biorreator de agitação mecânica	31
4.3.2	Biorreator <i>airlift</i>	33
4.4	PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS RELATIVOS À TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	35
4.4.1	Análise da transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica	37
4.5	METODOLOGIA ANALÍTICA	40
4.5.1	Coleta e amostragem	40
4.5.2	Açúcares redutores e açúcares redutores totais	40
4.5.3	Concentração celular	41
4.5.4	Atividade de pectinases	41
4.6	CÁLCULO DE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	43
4.6.1	Velocidade específica de crescimento celular	43
4.6.2	Fatores de produção e conversão e de produtividade do processo	43
4.6.3	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio isento de células	44
4.6.4	Velocidade de circulação do fluido	46
4.7	DEGRADAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PECTINA	46
4.8	COMPARAÇÃO DE CORRELAÇÕES OU MODELOS BASEADOS EM DADOS EMPÍRICOS COM DADOS EXPERIMENTAIS PARA A ESTIMATIVA DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA ..	47
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA	49
5.1.1	Ensaio de transferência de oxigênio gás-líquido, em água destilada e em solução de pectina	49
5.1.2	Avaliação do ajuste dos dados experimentais a correlações empíricas para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	54
5.1.2.1	Correlações para a água	54
5.1.2.2	Correlações para soluções de pectina	59
5.1.3	Desesterificação das soluções de pectina	63
5.1.4	Avaliação do processo de produção de pectinases em reator de agitação mecânica	65
5.2	ANÁLISE DO PROCESSO EM BIORREATOR <i>AIRLIFT</i>	69
5.2.1	Ensaio de transferência de oxigênio gás-líquido	70

5.2.1.1	Ensaio com água destilada	70
5.2.1.2	Ensaio com solução de pectina.....	72
5.2.2	Avaliação do processo de produção de pectinases.....	76
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	83
7	REFERÊNCIAS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relações geométricas para impelidores dos tipos Rushton e <i>pitched blade</i> que validam as curvas de número de potência em função do número de Reynolds	23
Tabela 2 – Especificações geométricas do biorreator de agitação mecânica	32
Tabela 3 – Dimensionamento dos tubos do <i>airlift</i>	34
Tabela 4 – Variáveis e codificação dos níveis para análise do processo de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica	38
Tabela 5 – Matriz com os dados codificados e variáveis para análise do processo de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica	38
Tabela 6 – Propriedade dos fluidos de processo, a 28°C	49
Tabela 7 – Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água	59
Tabela 8 – Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina 0,5 e 1,0%(m/v)	63
Tabela 9 – Funções lineares que representam a correlação empírica descrita por Badino Jr. <i>et al.</i> (2001) e sua adaptação para descrever os dados de determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina 0,5 e 1,0%(m/v).....	63
Tabela 10 – Reajuste do pH das soluções de pectina 1,5%(m/v) desesterificadas para pH 2..	65
Tabela 11 – Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de agitação mecânica equipado com aspersor de gás do tipo ferradura (condição I), aquário (condição II) e aquário com utilização de pectina desesterificada (condição III).....	68
Tabela 12 – Coeficiente volumétrico de transferência de massa [h ⁻¹], em água destilada quando, utilizados diferentes tipos de aspersores de gás, em <i>airlift</i>	70
Tabela 13 – Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator <i>airlift</i> equipado com aspersor de gás do tipo aquário (externo) (condição I), pedra sinterizada (condição II) e aquário (externo) com utilização de pectina desesterificada (condição III).....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipo, classificação e microrganismos produtores de enzimas pécicas	5
Quadro 2 – Correlações utilizadas no projeto de construção de biorreatores de agitação mecânica.....	7
Quadro 3 – Exemplos de aplicações de biorreatores de agitação pneumática para obtenção de produtos de interesse.....	11
Quadro 4 – Impelidores, correntes de fluxo e suas aplicações na indústria.....	18
Quadro 5 – Codificações das configurações de impelidores utilizadas nos ensaios em biorreator de agitação mecânica	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura primária das substâncias pécticas.....	4
Figura 2 – Visão geral de um biorreator de agitação mecânica	8
Figura 3 – Desenho esquemático de um <i>airlift</i> de circulação interna.....	9
Figura 4 – Desenhos esquemáticos de projeto de construção de biorreatores <i>airlifts</i>	10
Figura 5 – Desenhos esquemáticos de alguns exemplos de aspersores do gás	15
Figura 6 – Correntes de fluxo geradas por diferentes tipos de impelidores	17
Figura 7 – Número de potência em função do número de Reynolds para impelidores dos tipos Rushton (1), <i>pitched blade</i> (2) e hélice marítima (3), para fluidos Newtonianos sem aeração	22
Figura 8 – Reator de agitação mecânica e unidade de controle de parâmetros de processo	31
Figura 9 – Impelidores <i>pitched blade</i> (A) e Rushton (B).....	32
Figura 10 – Aspersores de gás utilizados nos ensaios em biorreator de agitação mecânica	33
Figura 11 – Cuba do biorreator <i>airlift</i>	34
Figura 12 – Aspersores de gás utilizados nos ensaios em biorreator <i>airlift</i>	35
Figura 13 – Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica	36
Figura 14 – Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator <i>airlift</i>	37
Figura 15 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica em função da vazão específica de gás em água destilada, quando utilizadas diferentes configurações de impelidores, aeradores e frequências dos agitadores.....	50
Figura 16 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica em função da vazão específica de gás em solução de pectina 2%(m/v), quando utilizadas diferentes configurações de impelidores, aeradores e frequências dos agitadores ..	51
Figura 17 – Diagrama de Pareto para os ensaios com água e solução de pectina 2%(m/v) acerca da análise do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	Erro! Indicador não definido.
Figura 18 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974) e Richards (1961), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B)	56
Figura 19 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974), adaptada, e Richards (1961), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B)	56
Figura 20 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974) e Wang <i>et al.</i> (1979), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B)	57
Figura 21 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974), e Wang <i>et al.</i> (1979) adaptada, quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B).....	58

Figura 22 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Wang <i>et al.</i> (1979), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B)	61
Figura 23 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Badino Jr. <i>et al.</i> (2001), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B)	62
Figura 24 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Badino Jr. <i>et al.</i> (2001) adaptada, quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores <i>pitched blade</i> (B).....	62
Figura 25 – Perfis de viscosidade aparente em função do pH de diferentes concentrações de pectina... ..	64
Figura 26 – Aspecto das soluções de pectina 1,5%(m/v) em diferentes valores de pH	65
Figura 27 – Variação da biomassa celular (A), açúcares redutores totais (B), oxigênio dissolvido (C), pH (D), vazão específica de gás (E) e atividade de pectinases totais (F), em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de agitação mecânica equipado com três impelidores do tipo Rushton e diferentes aspersores de gás	68
Figura 28 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator <i>arlift</i> em função da vazão específica de gás, em água destilada, quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás.....	59
Figura 29 – Velocidade de circulação da água destilada em biorreator <i>airlift</i> em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás .	59
Figura 30 – Tempo de circulação da água destilada em biorreator <i>airlift</i> em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás.....	60
Figura 31 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator <i>airlift</i> em função da vazão específica de gás, em solução de pectina 2%(m/v), quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás	60
Figura 32 – Velocidade de circulação da solução de pectina 2%(m/v) em biorreator <i>airlift</i> em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás.....	76
Figura 33 – Variação da biomassa celular (A), açúcares redutores totais (B), oxigênio dissolvido (C), pH (D), vazão específica de gás (E) e atividade de pectinases totais (F), em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator <i>airlift</i> equipado com diferentes aspersores de gás.....	78
Figura 34 – Aspecto de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator <i>airlift</i> (condição III), em diferentes tempos de processo. A – 2h; B – 14h; C – 18h; D – 23h; E – 24h; F – 90h.. ..	79

LISTA DE SIGLAS

a: área interfacial gás-líquido	f_c : fator de correção
a: coeficiente linear da curva de calibração	FDA: <i>Food and Drugs Administration</i>
A: percentual de redução da viscosidade	FES: fermentação em estado sólido
Ag: água	$f_{m\acute{a}x}$: máxima frequência dos agitadores
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	FSm: fermentação em estado submerso
Aq: aerador tipo aquário	GRAS: <i>generally recognized as safe</i>
AR: açúcares redutores	H: altura do tanque
ART: açúcares redutores totais	H: constante de Henry
A_s : área da seção transversal do tanque	H_i : altura dos impelidores
b: coeficiente angular da curva de calibração	H_L : altura do fluido
c: constante	IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas
C: concentração de oxigênio dissolvido num dado instante de tempo	k, k' : constantes de proporcionalidade
C*: concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio	k_L : coeficiente convectivo de transferência de massa
C_i : altura desde o centro do impelidor até o fundo do tanque	K_{La} : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
CMC: carboximetil celulose	$K_{La_{calculado}}$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio calculado
D: diâmetro do impelidor	$K_{La_{experimental}}$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio experimental
D_b : diâmetro da chicana	K_v : coeficiente volumétrico de absorção
dC/dt : variação da concentração do oxigênio dissolvido com o tempo	K_3 : constante que depende da geometria do sistema, assim como do sistema de unidades empregado
D_i : diâmetro do impelidor	L_B : largura da pá do impelidor
dil: diluição do extrato enzimático	LBIO: laboratório de bioprocessos
DNS: ácido 3,5 di-nitro-salicílico	N: frequência dos agitadores
D_t : diâmetro do tanque	N_i : número de impelidores
dX/dt : velocidade instantânea de crescimento	LPOL: Laboratório de polímeros
F: aerador tipo ferradura	N_p : número de potência
	P: atividade de pectinases

P: solução de pectina 2% (m/v)	$t_{f,máx}$: tempo de permanência de $f_{máx}$.
PB: impelidor tipo <i>pitched blade</i>	$t_{P,máx}$: tempo em que ocorre a máxima atividade de pectinases
PE: pectinesterases	$t_{Q_v,máx}$: tempo de permanência de $Q_{v,máx}$
PG: poligalacturonases	$t_{X,máx}$: tempo em que ocorre X_{max}
P_g : potência com aeração	U: unidade enzimática
PGL: poligalacturonatolases	UCS: Universidade de Caxias do Sul
$P_{g/V}$: potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação	v: volume do preparado enzimático
$P_{máx}$: máxima atividade de pectinases	V_d : velocidade de circulação do fluido no <i>downcomer</i>
PMG: polimetilgalacturonases	v_s : velocidade superficial do ar
PMGL: polimetilgalacturonatolases	x: distância entre 2 pontos, marcados no tubo externo
P_o : potência sem aeração	$X_{máx}$: máxima concentração celular
PP: protopectinases	$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto
P_v : potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação	$Y_{P/X}$: fator de produção específica
p_v : produtividade volumétrica	$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células
Q: vazão de ar	W_B : altura da pá do impelidor
$Q_{v,máx}$: máxima vazão específica de gás	WBE: <i>wheat bran extract</i>
R: impelidor tipo Rushton	W_{BF} : largura da chicana
Re: número de Reynolds	α : constante de proporcionalidade
S_{cons} : consumo total de substrato	α : percentual da saturação
$S_{P,máx}$: concentração de substrato no instante em que há a máxima atividade de pectinases	β : percentual da saturação
STR: <i>stirred tank reactor</i>	δ : constante de proporcionalidade
$S_{X,máx}$: concentração de substrato no instante em que há a máxima concentração celular	μ : viscosidade do fluido
S_0 : concentração inicial de substrato	μ_{ap} : viscosidade aparente do fluido
t: tempo	μ_x : velocidade específica de crescimento celular
t: tempo de circulação	$\mu_{x,máx}$: velocidade específica de crescimento celular máxima
t: tempo necessário para que o traçador passasse por x	ρ : massa específica do fluido

RESUMO

Em biorreatores de agitação mecânica (STR), a circulação e a mistura do fluido são influenciadas pela configuração do equipamento e pela disposição dos impelidores e aspersores de gás. Já em biorreatores *airlift*, sua geometria e, principalmente, o tipo e forma de aspersão de oxigênio, têm primordial efeito tanto na transferência de oxigênio quanto no crescimento microbiano e na formação de produtos. Para o cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301, o suprimento de oxigênio é um parâmetro fundamental, em razão do metabolismo unicamente aeróbio deste microrganismo. Neste contexto, analisou-se o transporte de massa gasosa em ambos os equipamentos, contendo fluidos com viscosidades distintas: água destilada e diferentes concentrações de soluções de pectina. Com estudos de mecânica dos fluidos, correlações matemáticas empíricas para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foram utilizadas para relacionar os resultados experimentais com os calculados. A produção de pectinases também foi avaliada nesses equipamentos. O meio de cultivo continha sais nutrientes, extrato de levedura, glicose e pectina cítrica. Avaliaram-se diferentes configurações de impelidores Rushton e *pitched blade*, além de várias geometrias de aspersores de gás, tais como ferradura de aço inoxidável, pedra sinterizada, aeradores de aquário e de latão e funis de vidro sinterizado. Em STR, a análise fatorial mostrou que os maiores incrementos de K_{La} foram com a combinação de impelidores Rushton, em água, com aspersor do tipo aquário a 700rpm e 1,71L/L/min; em *airlift*, com o aspersor aquário, alocado na região externa do tubo interno, e com o aspersor pedra sinterizada. O modelo proposto por Miller (1974) foi o mais adequado para determinar a potência requerida pelos fluidos deste trabalho, em STR e sob aeração. O modelo de Wang *et al.* (1979), com adaptações, ajustou-se aos dados com água; e para as soluções de pectina, a correlação descrita por Badino Jr. *et al.* (2001) foi melhor ajustada. Três ensaios para produção enzimática foram processados em STR: ambos com três impelidores Rushton, aspersores dos tipos ferradura (A), aquário (B) e aquário com meio com pectina desesterificada (C). Em *airlift*, foram testadas as condições produtivas com os aspersores do tipo aquário (externo) (A), pedra sinterizada (B) e aquário (externo), com pectina desesterificada (C). Em STR, o melhor resultado de K_{La} , em meio isento de células, foi na condição C ($29,88h^{-1}$), bem como vantagens econômicas como o menor tempo de permanência da máxima frequência dos agitadores ($t_{f,máx}$) (A: 23h; B: 8,5h; C:5h). Porém, resultado superior de máxima produção de pectinases foi na condição B (A: 24,60U/mL; B: 25,53U/mL; C: 13,36U/mL) em $t_{f,máx}$ inferior à condição A. Em *airlift*, o transporte de oxigênio, em meio isento de células, foi mais favorecido em A ($21,96h^{-1}$), bem como o menor tempo máximo para manter a máxima vazão específica do gás (A: 29h; B: 72h; C: 57h). Além disso, a máxima atividade enzimática foi superior na mesma condição (A: 24,61U/mL; B: 21,94U/mL; C: 2,29U/mL). Assim, conclui-se que, desde que planejadas as condições operacionais e de processo de produção de pectinases de *A. oryzae*, ambos os biorreatores podem ser aplicados na produção de pectinases fúngicas.

ABSTRACT

In stirred tank reactors (STR), circulation and mixing of fluid are influenced by the reactor configuration and by how the impellers and the gas spargers are arranged in them. On the other hand, in airlift bioreactors, their geometry and especially the type and form of oxygen sparging have an effect on both oxygen transfer and on microbial growth and product formation. Oxygen supply for the cultivation of *Aspergillus oryzae* IPT-301 is a key parameter due to the aerobic metabolism of this microorganism. In this context, oxygen transfer in both equipments was analyzed. They contained fluids with different viscosities: distilled water and different concentrations of pectin solutions. Through the use of fluid mechanics studies, empirical mathematical correlations were used in order to determine the volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) to match experimental and calculated results. Pectinase production was also assessed in those devices. The culture medium contained salts, yeast extract, glucose and citrus pectin. Different Rushton and pitched blade impeller configurations were evaluated, as well as various gas sparger geometries, such as stainless steel horseshoe, sintered stone, aquarium and brass spargers, and also sintered glass funnels. In STR, factorial design showed that the largest K_La value was obtained with the combination of Rushton impellers, in water, with the aquarium sparger, at 700rpm and 1.71L/min; in airlift, with the same sparger, put in the outer space of the inner tube and with the sintered stone sparger. The empirical correlation proposed by Miller (1974) was the most suitable one to determine the power requirement by the fluids in this work, in STR and under aeration. The correlation proposed by Wang *et al.* (1979), with adaptations, was better adjusted to the data set with water; the correlation described by Badino Jr. *et al.* (2001) was better suited for pectin solutions. Three tests for enzyme production were processed in STR: with three Rushton impellers, in all of them, and horseshoe (A), aquarium (B) and aquarium with non-esterified pectin medium (C) spargers. In airlift, enzyme production was tested with aquarium (external) (A), sintered stone (B) and aquarium (external) with non-esterified pectin (C) spargers. In STR, the best result of K_La in cell-free medium was provided in condition C ($29.88h^{-1}$), as well as economic advantages such as shorter length of maintenance of the maximum impeller speed ($t_{f,m\acute{a}x}$) (A: 23h; B: 8.5h; C: 5h). Nonetheless, higher pectinase production was obtained in condition B (A: 24.60U/mL; B: 25.53U/mL, C: 13.36U/mL) in $t_{f,m\acute{a}x}$ shorter than in condition A. In airlift, higher oxygen transfer in cell-free medium was obtained in condition A ($21.96h^{-1}$), as well as the lowest length of maintenance of the maximum specific gas flow rate (A: 29h; B: 72h; C: 57h). Furthermore, maximum enzyme activity was higher in the same condition (A: 24.61U/mL; B: 21.94U/mL, C: 2.29U/mL). Thus, we conclude that if the operational conditions for pectinase production by *A. oryzae* are well planned, both bioreactors can be applied for the production of fungal pectinases.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases constituem um grupo de enzimas utilizadas na indústria de alimentos, na extração e clarificação de sucos, na produção de vinhos e na indústria de óleos vegetais. São catalisadores responsáveis pela degradação de substâncias pécticas, que conferem alta viscosidade às polpas e aos sucos, auxiliando na filtração e na concentração.

A obtenção das pectinases pode ser realizada por processo fermentativo submerso (FSm) ou em estado sólido (FES), utilizando fungos do gênero *Aspergillus*, constituindo uma linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul (LBIO/UCS). A condução destes cultivos fúngicos em FSm tem como um dos principais problemas a presença de pectina, que provoca o aumento da viscosidade do meio, prejudicando a transferência de oxigênio para o meio e, em decorrência, o crescimento e a manutenção da população microbiana.

Parâmetros como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido podem ser, em geral, bem controlados em processos aeróbios submersos realizados em biorreatores com agitação mecânica, conhecidos pela sigla STR (*stirred tank reactor*), que são dotados de impelidores que proporcionam mistura e transferência de massa. Alternativamente, podem ser usados biorreatores pneumaticamente agitados, como os do tipo *airlift*, cuja circulação do fluido acontece devido às diferenças de densidades aparente do líquido.

Para cultivos aeróbios em STR normalmente é requerida uma alta potência aplicada sobre o eixo para suprir o oxigênio necessário para o cultivo e manter a homogeneidade do sistema, haja vista que, com o crescimento microbiano, tem-se a elevação da viscosidade do meio associada ao uso do indutor, ocasionando mudanças reológicas do fluido. No caso de cultivos de fungos filamentosos, pode induzir a destruição parcial do micélio, causada pelas pás dos impelidores, bem como a inviabilização da população microbiana para o crescimento celular e a produção enzimática. Uma forma de melhorar a transferência de massa é avaliar o emprego de diferentes tipos de impelidores e aeradores. No caso de cultivos em reatores tubulares do tipo *airlift*, devido ao fato de esses equipamentos não possuírem sistema de agitação mecânica, fatores como a temperatura, o pH e o suprimento e a demanda de oxigênio devem ser monitorados de maneira eficaz, já que a transferência de calor e de massa é influenciada pelas limitações de mistura do sistema.

Na literatura, equações empíricas são descritas por vários autores de modo a tentar explicar o processo de transporte de oxigênio. Para isso, modelos empíricos são utilizados

para relacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) com as variáveis de processo. Entretanto, muitos dos dados obtidos não se ajustam aos modelos propostos na literatura. Por isso, a correlação mais utilizada, por vezes, é aquela que satisfaça a maioria das variáveis estudadas e as observações feitas sobre aproximadamente quase todos os parâmetros.

Neste contexto, este trabalho teve como foco o estudo de biorreatores dos tipos STR e *airlift*, em escala de bancada. Diferentes configurações de aspersores de gás e impelidores foram utilizados, conforme o caso, de modo a facilitar a transferência de oxigênio para o meio de cultivo de *A. oryzae* IPT-301, com vistas ao incremento do crescimento microbiano e à produção de pectinases. Adicionalmente, avaliou-se o ajuste dos dados experimentais relativos à transferência de oxigênio ao meio a modelos matemáticos descritos na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a transferência de oxigênio para meio de cultivo microbiano líquido em biorreatores com agitação mecânica (STR) e *airlift*, em escala de bancada, tendo como processo modelo a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301.

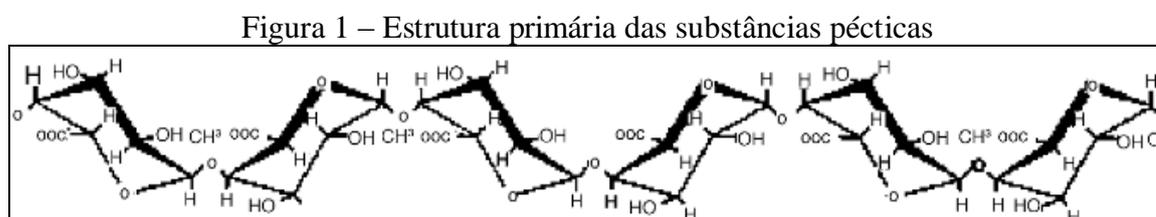
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da frequência dos agitadores, da vazão específica de gás e da configuração dos impelidores e aeradores sobre a transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica.
- analisar o efeito da viscosidade de fluidos distintos (água destilada e solução de pectina) sobre a transferência de oxigênio (parâmetro: K_La) em biorreator de agitação mecânica.
- correlacionar modelos encontrados na literatura que avaliem empiricamente a transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica com os dados experimentais.
- avaliar a influência do volume do fluido, da vazão específica de gás, da configuração de aeradores e da circulação do líquido sobre a transferência de oxigênio (parâmetro: K_La) em biorreator do tipo *airlift*.
- analisar o efeito da viscosidade de fluidos distintos (água destilada e solução de pectina) sobre a transferência de oxigênio em biorreator *airlift*.
- definir as condições de operação e configurações de biorreatores mais apropriadas para o crescimento microbiano e a produção de pectinases de *A. oryzae* IPT-301.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

As enzimas pectinolíticas são componentes capazes de agir sobre as substâncias pécticas (Figura 1), também genericamente conhecidas como pectinas (JAYANI *et al.*, 2005). Estas substâncias, que estão presentes naturalmente na parede celular e nos espaços intercelulares de plantas (CAFFALL; MOHNEN, 2009), são indispensáveis para que ocorra o crescimento celular (PALIN; GEITMANN, 2012) e determinam a firmeza das frutas (CYBULSKA; ZDUNEK; KONSTANKIEWICZ, 2011).



Fonte: Rexová-Benková, Markovič (1976)

As pectinas estão presentes na estrutura de variadas espécies do reino vegetal e representam cerca de 0,5 a 4,0% de sua massa seca. Os processos físicos usados na indústria de sucos, como o esmagamento de frutas, levam geralmente à obtenção de produtos com alta viscosidade. Dessa forma, a extração do suco é dificultada e, por isso, são adicionados preparados enzimáticos contendo pectinases para degradar as substâncias pécticas, reduzir a viscosidade e aumentar do rendimento do processo (KASHYAP *et al.*, 2001).

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS PÉCTICAS

Segundo Alimardani-Theuil *et al.* (2011), no ano de 2011, o mercado industrial estimou a produção de enzimas pécticas em torno de 70 milhões de dólares (correspondente a cerca de 5% das vendas em enzimas). Essas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de substrato preferencial. O modo de ação ocorre por transeliminção ou hidrólise e dependendo do tipo de clivagem, podem ser classificadas como endo- ou exo- (KASHYAP *et al.*, 2001). Os tipos de enzimas pécticas, suas classificações e alguns microrganismos produtores estão mostrados no Quadro 1.

Quadro 1 – Tipo, classificação e microrganismos produtores de enzimas pécicas

Tipo de pectinase	Classificação	Microrganismo produtor	Referência
Pectinesterases (PE)	Pectina metilesterase	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pan <i>et al.</i> (2014)
Enzimas despolimerizantes	Polimetilgalacturonases (PMG)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Anthonomus grandis</i>	Pashova <i>et al.</i> (1999) King (1973)
	Poligalacturonases (PG)	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Marcus <i>et al.</i> (1986) Fontana <i>et al.</i> (2009)
	Polimetilgalacturonatoliasas (PMGL) Poligalacturonatoliasas (PGL)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Zou <i>et al.</i> (2013) Fang <i>et al.</i> (2011)
Protopectinases	Protopectinases (PP)	<i>Geotrichum klebahnii</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Zapata <i>et al.</i> (2012) Chen <i>et al.</i> (2014)

Como mostrado no Quadro 1, alguns processos biotecnológicos utilizam linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus* para produção de enzimas pécicas. O fungo *A. niger*, por sua vez, é largamente utilizado devido a sua classificação GRAS (*generally recognized as safe*) da *Food and Drugs Administration* (FDA), órgão americano responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, cujas normas são internacionalmente aceitas. No Brasil, o fungo *A. niger* e outros fungos do gênero *Aspergillus* (*A. awamori*, *A. foetidus* e *A. oryzae*), além de microrganismos como *Penicillium simplicissium*, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, estão relacionados na Resolução RDC 26/2009 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como microrganismos passíveis de utilização na indústria de alimentos para produção de pectinases.

Dentre os estudos encontrados na literatura em que são utilizados esses microrganismos, Demir e Tari (2014) utilizaram linhagens mutantes de *A. sojae* para produção de poligalacturonases (PG) tendo como principal substrato farelo de trigo, sem ser necessária a adição de outros suplementos nutritivos ou indutores. Gómez Sanchez *et al.* (2012) avaliaram a produção de exo-PG a partir de *A. flavipes* FP-500. Fontana *et al.* (2009) compararam a produção de endo- e exo-PG de *A. oryzae*.

3.3 DEGRADAÇÃO DA PECTINA

A pectina pode ser degradada através de três métodos distintos de hidrólise: ácida, alcalina ou enzimática. Nos três tipos de processos, o objetivo é eliminar um número variável de grupos metoxila para que ocorra a formação de ácido poligalacturônico. Assim, tem-se um aumento da solubilidade do polímero devido à grande quantidade de grupos carboxílicos (BRAVERMAN, 1980).

A hidrólise ácida envolve o rompimento das ligações glicosídicas α -1,4 e a desmetoxilação dos grupos esterificados da pectina. É empregada geralmente em processos analíticos e requer um tempo prolongado para que ocorra a completa hidrólise da cadeia polimérica para que haja a liberação dos monômeros de ácido galacturônico, ou seja, as características da pectina dificilmente são comprometidas, a não ser em condições extremas (BRAVERMAN, 1980; BOBBIO; BOBBIO, 1992)

Os métodos enzimáticos, por sua vez, são mais utilizados para aumentar o rendimento nos processos de extração de sucos (GARNA *et al.*, 2006).

Em reação alcalina, tem-se a rápida desmetoxilação polimérica. Por β -eliminação, a degradação inicia-se pelo rompimento da ligação glicosídica em β (C₄) ao grupo carboxílico do éster, o qual não é bom receptor de elétrons. Com sua ionização, dificulta-se a saída do grupo ligado em C₄ (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

3.4 BIORREATORES E PROCESSOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

As pectinases podem ser produzidas em cultivos microbianos conduzidos em estado submerso ou em estado sólido (PATIL; DAYANAND, 2006). Biorreatores de agitação mecânica ou *Stirred Tank Reactors* (STRs) e *airlift* podem ser utilizados para a produção de endo- e exo-poligalacturonases em estado submerso. Já em estado sólido, o cultivo é caracterizado pelo desenvolvimento do microrganismo sobre uma superfície sólida sem a presença de água livre, porém com umidade na faixa de 15 a 70%. Neste caso, por exemplo, são utilizados biorreatores do tipo tanque rotativo (FONTANA *et al.*, 2009; SANDRI *et al.*, 2011; FONTANA, SILVEIRA, 2012; MENEGHEL, 2013).

3.4.1 Biorreatores para processos submersos de produção enzimática

3.4.1.1 Biorreatores de agitação mecânica

Os biorreatores de agitação mecânica são convencionalmente utilizados na indústria por gerarem baixos custos de operação. Em larga escala, são geralmente fabricados em aço inoxidável; em escala laboratorial, em vidro. Chicanas são acopladas aos tanques de modo a prevenir a formação de vórtice causado por altas frequências de agitação. Em vasos de diâmetro menor que 3 metros, são utilizadas 4 chicanas; para diâmetros maiores, 6 chicanas. Tipicamente, 75% do volume de trabalho é preenchido com o fluido; o restante do volume usualmente serve para a passagem de ar e eventual formação de espuma. Caso a altura do biorreator seja igual ao seu diâmetro, usualmente utiliza-se um agitador; se essa razão for maior, são necessários mais agitadores e a distância entre eles deve ser igual (NAJAFPOUR, 2007). Demais correlações usualmente utilizadas nestes tipos de biorreatores são apresentadas no Quadro 2. Na Figura 2 são mostrados, esquematicamente, os componentes típicos de um biorreator agitado mecanicamente.

Quadro 2 – Correlações utilizadas no projeto de construção de biorreatores de agitação mecânica

	Limite mínimo	Limite máximo
Largura das chicanas	$D_t/10$	$D_t/12$
H/D_t	2/1	6/1
D_t/D_b	10	12
	Valor usual	
Distância entre o aerador e o impelidor	$D_i/2$	
Potência mínima	$100W/m^3$	
Velocidade terminal do impelidor (mínima)	1,5m/s	

D_t : diâmetro do tanque, H: altura do tanque, D_b : diâmetro da chicana, D_i : diâmetro do impelidor

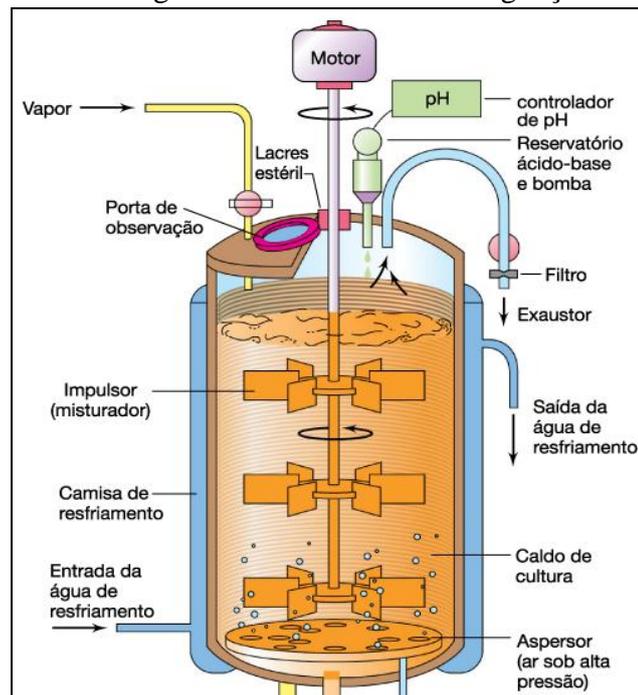
Fonte: adaptado de Najafpour (2007)

Os impulsores, responsáveis pela agitação do sistema, favorecem a transferência de massa entre a área interfacial gás-líquido. Porém, o estresse metabólico causado pelas condições de cisalhamento torna-se uma desvantagem em processos para produção enzimática (VENNEKER *et al.*, 2002; AHMADI *et al.*, 2011).

Felse e Panda (2000) avaliaram a influência da frequência do agitador para produzir

quitinase de *Trichoderma harzianum*. Os autores inferiram que para frequências dos agitadores mais baixas, maiores valores de atividade enzimática e de biomassa foram obtidos. Em frequências superiores, menores rendimentos em termos de produtividade e crescimento microbiano foram alcançados. Limitações no processo de transferência de massa foram observadas a baixas frequências, indicando que a agitação tem influência nos parâmetros cinéticos de produção enzimática.

Figura 2 – Visão geral de um biorreator de agitação mecânica



Fonte: Madigan *et al.* (2010)

A influência da agitação sobre o crescimento e na produção de xilanase de *Aspergillus oryzae* em biorreator STR foi estudada por Chipeta *et al.* (2008). Os autores relataram que, com o aumento na velocidade terminal dos impelidores, não se tem mudança na atividade enzimática, ao contrário do que acontece com o crescimento microbiano – a 3,12m/s, a atividade máxima de xilanase e biomassa obtidas foram de 94U/mL e 2,6g/L, respectivamente. Quando empregada a velocidade de 1,56m/s, a atividade enzimática e a biomassa foram de 89U/mL e 3,5g/L, respectivamente.

Meneghel *et al.* (2014) avaliou a produção de pectinases a partir de *A. oryzae* em processo submerso. Ensaio em condições limitantes e não limitantes de oxigênio foram realizados em biorreator de agitação mecânica. A condução do processo sob condições não limitadas de oxigênio dissolvido no meio de cultivo resultou em ganho substancial na

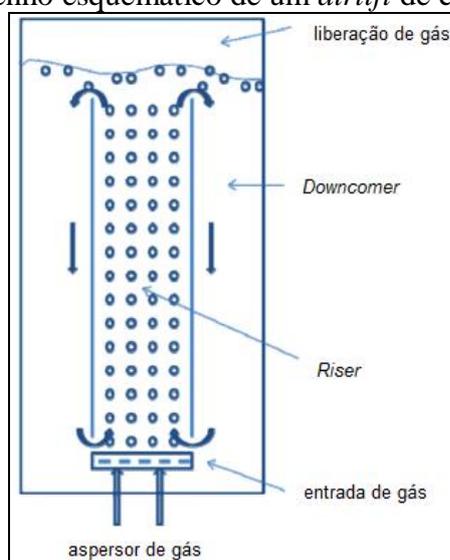
produção de pectinases.

3.4.1.2 Biorreatores de agitação pneumática

O projeto de biorreatores alternativos aos STRs vem sendo estudado, como biorreatores de coluna de bolhas (CUNHA *et al.*, 2012) e *airlifts* de circulação interna e externa, como destacado por Fontana *et al.* (2009) e Fontana e Silveira (2012), que utilizaram esses equipamentos para a produção de endo-PG e exo-PG a partir de linhagens fúngicas de *A. oryzae*. As características do processo e o tipo de microrganismo utilizado foram considerados, juntamente com a escolha do biorreator para o cultivo microbiano.

Ao contrário do que ocorre com o STR, a mistura do fluido em biorreatores *airlift* não acontece mecanicamente e o cisalhamento ocorre a taxas mais baixas devido ao sistema de agitação. A aspersão do gás ocorre por uma região de subida, chamada *riser*, e a recirculação ocorre pelo *downcomer*, região de descida, por onde o líquido retorna à base do reator (Figura 3), havendo, assim, um gradiente de pressão e de densidade do fluido (PILZ; HEMPEL, 2005; NAJAFPOUR, 2007).

Figura 3 – Desenho esquemático de um *airlift* de circulação interna



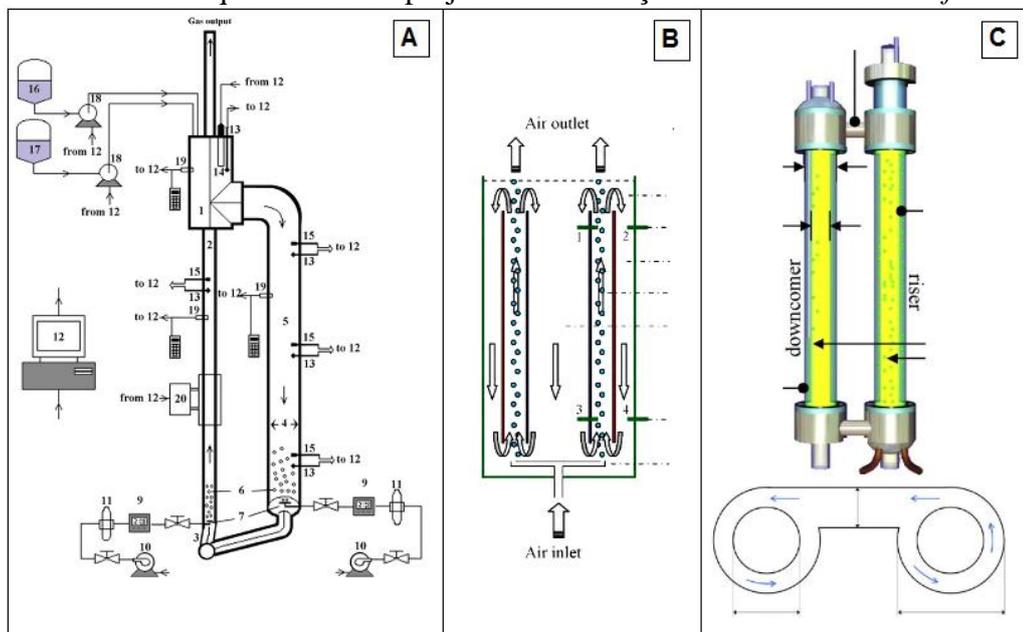
Fonte: adaptado de Zimmerman *et al.* (2009)

Na literatura, são encontradas diversas configurações de biorreatores *airlift*, com vários desenhos dimensionais. Na Figura 4 estão apresentados alguns projetos desses tipos de equipamentos.

Devido ao projeto de construção simplificado, às características fluidodinâmicas, à

baixa potência requerida, ao baixo cisalhamento e às condições de mistura e de processos de transferência de calor e massa, a utilização de *airlifts* vem se tornando uma alternativa aos STRs. Outras vantagens são relacionadas com a simples operação e o baixo consumo de energia (YEN; LIU, 2014), altas taxas de transferência de calor e de massa gás-líquido, distribuição uniforme de cisalhamento e boa mistura (LIU *et al.*, 2008). Entre as desvantagens, destacam-se o alto custo com a fabricação de biorreatores em larga escala, a dificuldade na separação gás/líquido quando há formação de espuma, bem como na manutenção de níveis consistentes de fontes de carbono, oxigênio e nutrientes por toda a extensão do reator, haja vista que, com o crescimento microbiano, as condições de operação são alteradas constantemente (NAJAFPOUR, 2007).

Figura 4 – Desenhos esquemáticos de projeto de construção de biorreatores *airlifts*



(A) Fotobiorreator de circulação externa, utilizado para cultivo de microalgas; (B) *airlift* de circulação interna modificado, contendo dois tubos internos concêntricos e em série, para análise de modelagem matemática; (C) fotobiorreator de circulação externa de câmaras anulares, utilizado para cultivo de microrganismos fotossintéticos.

Fonte: adaptado de Behin (2010), Loubiere *et al.* (2011) e Pirouzi *et al.* (2014).

Estes tipos de equipamentos são utilizados nas indústrias petroquímicas, de processamento mineral e biotecnológicas (MERCHUK, 2003; PILZ, HEMPEL, 2005), além da sua utilização em estudos de processos de produção de pectinases (FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA; SILVEIRA, 2012).

O projeto de construção de um biorreator de agitação pneumática geralmente está relacionado com algumas correlações dimensionais. Usualmente, a altura de um *airlift* é cerca

de 10 vezes o diâmetro da coluna. Para biorreatores utilizados em larga escala (aproximadamente 500m³), uma alternativa são os fermentadores do tipo coluna de bolhas, devido a sua simples construção e operação (NAJAFPOUR, 2007).

Em estudo acerca dos efeitos da geometria, circulação do fluido e transferência de massa em *airlift* de circulação interna, Gouveia *et al.* (2003) provaram que pequenas mudanças nas dimensões do biorreator afetam o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), principalmente devido ao volume livre no topo do equipamento. Quando utilizado o volume mínimo de trabalho, a demanda de massa é suficiente para suprir as necessidades microbianas para obtenção de biomassa, podendo ser possível operar o equipamento sob batelada alimentada.

Muitos são os estudos encontrados na literatura acerca da utilização de biorreatores sob agitação pneumática para, por exemplo, caracterização hidrodinâmica (LUO *et al.*, 2011; GHARIB *et al.*, 2013; MIAO *et al.*, 2014), transferência de massa (FAKHARI *et al.*, 2014; PIROUZI *et al.*, 2014) e distribuição do ar (LUO *et al.*, 2011). Porém, muitos desses estudos não objetivam a obtenção de produtos de interesse e de valor agregado. No Quadro 3, são apresentados alguns exemplos de processos biotecnológicos realizados em biorreatores de agitação pneumática com esses objetivos.

Quadro 3 – Exemplos de aplicações de biorreatores de agitação pneumática para obtenção de produtos de interesse

Tipo de biorreator	Microrganismo	Produto(s)	Referência
<i>Airlifts</i> de circulação interna e externa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo-PG e exo-PG	Fontana, Silveira (2012)
Fotobiorreator	<i>Anabaena sp.</i>	Bio-hidrogênio	Nayak <i>et al.</i> (2014)
<i>Airlift</i> de circulação interna	<i>Aspergillus niger</i>	Xilanases	Michelin <i>et al.</i> (2013)
<i>Airlift</i> de circulação interna	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2-feniletanol	Mihal <i>et al.</i> (2013)
Fotobiorreator	<i>Scenedesmus sp.</i>	Lipídeos	Jones, Harrison (2014)
<i>Airlift</i> de circulação interna	<i>Penicillium echinulatum</i>	Xilanases e celulases	Ritter <i>et al.</i> (2013)
<i>Airlift</i> de circulação externa	<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilase	Yuguo <i>et al.</i> (2000)
<i>Airlift</i> de circulação externa	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Yuguo <i>et al.</i> (1999)

3.4.2 Parâmetros de processo que influenciam a produção de pectinases

Dentre os parâmetros que estão relacionados com a obtenção de pectinases em processos submersos, alguns podem ser destacados. O processo de produção de pectinases sofre substanciais modificações reológicas devido à alta viscosidade do indutor, associada ao crescimento microbiano. O suprimento e a demanda de oxigênio pela população microbiana influenciam os mecanismos de transferência de oxigênio desde as bolhas de gás até o interior das células microbianas. A agitação e a mistura, por sua vez, garantem o suprimento de nutrientes e o oxigênio necessário para as atividades metabólicas microbianas.

3.4.2.1 Reologia

Os fungos filamentosos são largamente utilizados para a produção de complexos enzimáticos devido a sua alta diversidade metabólica. Todavia, tem-se uma grande complexidade quando se relaciona a morfologia desses microrganismos com os fenômenos de transporte, a viscosidade do meio de cultivo e a produtividade. Com isso, é preciso avaliar as características morfológicas relacionadas à obtenção de biomassa que, conseqüentemente, afetam a reologia do cultivo e a produtividade do sistema (WUCHERPFENNIG *et al.*, 2010).

Em estudo apresentado por Meneghel *et al.* (2014), foi possível verificar a importância da reologia do sistema de produção de pectinases por *Aspergillus oryzae*. O uso de um meio de fermentação limitante para o crescimento microbiano e a adição tardia do indutor enzimático (pectina cítrica) afetaram positivamente nas mudanças reológicas do sistema, em termos de viscosidade, bem como no suprimento de gás efetivo ao microrganismo. Em meio de cultivo com limitação de oxigênio e controle do pH em 4,0, foi observado intenso crescimento microbiano, porém baixa atividade enzimática. Já em meio de cultivo não-limitante do gás e controle tardio do pH, as mudanças reológicas do sistema foram mais acentuadas, com obtenção de biomassa a títulos inferiores, porém máxima atividade enzimática (120U/mL).

3.4.2.2 Suprimento e demanda de oxigênio

Os microrganismos aeróbios necessitam de uma disponibilidade ilimitada de oxigênio dissolvido no meio, necessária para o crescimento celular e responsável pela produção de metabólitos. Seu suprimento em cultivos submersos é promovido por meio da

dissolução de oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida, de modo a estar disponível para o consumo microbiano através da respiração. Quando em baixa disponibilidade, afeta diretamente o desempenho do processo (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; SCHMIDELL, 2001).

Um dos principais problemas da transferência de oxigênio, no entanto, é a sua baixa solubilidade em água. À pressão ambiente e à temperatura de 30°C – condições típicas de um processo aeróbio – a concentração de oxigênio saturado em água destilada é de 0,23mmol/L (7,5mg/L) (SCHMIDELL, 2001; WANG *et al.*, 1979).

Em cultivos em que o crescimento microbiano ocorre predominantemente na forma de *pellets*, como é o caso de fungos filamentosos, é importante a determinação da concentração crítica de oxigênio dissolvido abaixo da qual o metabolismo microbiano é severamente prejudicado. Nesses cultivos, a concentração de O₂ deve ser mantida em torno de 30 a 50% da saturação. Assim, para que o oxigênio seja transportado para o interior dos *pellets*, são necessárias altas concentrações de oxigênio dissolvido para manter altas velocidades específicas de respiração (SCHMIDELL, 2001).

Em estudo acerca dos parâmetros cinéticos para produção de exo-PG de *A. flavipes* FP-500 e análise do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) em biorreator de agitação mecânica e em frascos sob agitação, Gómez Sánchez *et al.* (2012) verificaram que o K_La foi modificado para biorreatores operados em diferentes frequências dos agitadores (120; 250; 300min⁻¹). Maiores valores de biomassa (4,14±0,21mg/mL) e atividade enzimática (69,9±3,5U/mL) foram obtidos com altos valores de K_La (63,6h⁻¹).

De modo a garantir o suprimento de oxigênio para as células microbianas e a mistura do sistema, Badino Jr. *et al.* (2001) relataram valores entre 300 e 700rpm e entre 0,2 e 1L/L/min, frequentemente utilizados em cultivos de fungos filamentosos em escala de bancada. O estudo foi analisado em biorreator de 10L, equipado com dois impelidores e quatro chicanas fixas.

O K_La, o desenho do biorreator e as condições de mistura e agitação do sistema foram analisadas por Michelin *et al.* (2013), que avaliaram a produção de xilanases de *A. niger* em biorreatores STR e *airlift*. Quando a atividade enzimática foi comparada a valores iguais de K_La (12h⁻¹), em STR e em *airlift*, os valores obtidos em *airlift* (7000U/L) foram superiores aos em STR (4500U/L), possivelmente por causa das interações envolvidas com a transferência de oxigênio, o cisalhamento fúngico e o desenho dos biorreatores.

3.4.2.3 Agitação e aeração

A agitação, uma das operações mais antigas e mais comuns na indústria de processos fermentativos industriais, é um parâmetro operacional controlado em processos bioquímicos e químicos. Tem influência na definição dos coeficientes de transferência de calor e de massa, evita a precipitação de sólidos e facilita sua dissolução, aumentando a capacidade de mistura gás/líquido e permitindo a manipulação da velocidade superficial dos gases liberados (GOGATE *et al.*, 2000).

A aeração, por sua vez, é responsável pelo suprimento de oxigênio para que os microrganismos executem suas atividades metabólicas. A função secundária da aeração é manter os microrganismos em suspensão, porém com uma pequena fração da agitação requerida (FOUST *et al.*, 1982).

O estresse hidrodinâmico foi considerado um dos parâmetros responsáveis pela baixa produção de lacases de *Pleurotus ostreatus* cultivado em biorreator de agitação mecânica, apesar de não estar diretamente relacionado com o crescimento microbiano. As interações existentes entre essa variável, juntamente com a agitação, a aeração e a adição de indutor, foram estudados por Tinoco-Valencia *et al.* (2014). Os autores inferiram que a baixas taxas de agitação ($0,9\text{kW/m}^3\text{s}$) e altas vazões volumétricas de ar ($0,5\text{L/L/min}$), foram obtidos os melhores valores em termos de atividade de lacases ($1,2$ e $3,8\text{U/mL}$, na ausência e na presença do indutor, respectivamente).

Albaek *et al.* (2011) avaliaram a produção enzimática a partir da utilização de *A. oryzae* sob diferentes operações de agitação e aeração, bem como distintos impelidores. Os autores constataram que as mais baixas atividades enzimáticas foram atingidas nas menores taxas de agitação e aeração. O tipo de impelidor não teve influência na concentração final do produto.

3.5 ASPERSORES DE GÁS

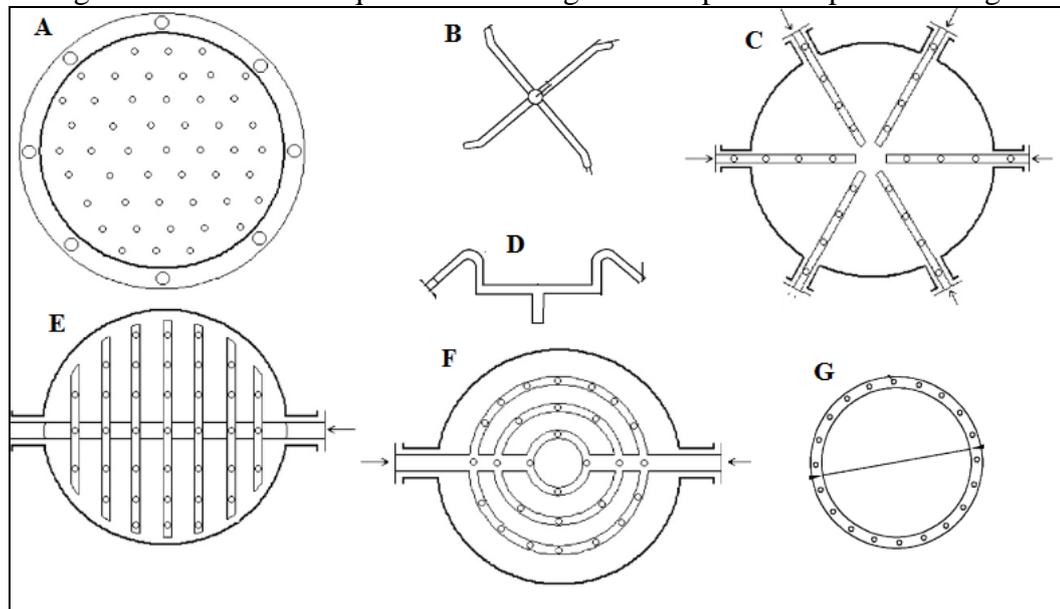
A injeção de ar pressurizado utilizado para a aeração e a agitação de processos com microrganismos aeróbios é feita por meio de aspersores, os quais possuem perfurações de variados tamanhos para a passagem do gás. O tamanho das bolhas formadas pelos aspersores afeta o transporte do gás até o interior das células microbianas e a dispersão do gás influencia diretamente no desempenho do biorreator: bolhas menores fornecem maior área interfacial

para a exposição do gás e, dessa forma, o transporte de oxigênio é facilitado (NAJAFPOUR, 2007).

Em muitos processos são utilizados anéis perfurados por auxiliarem de modo mais eficaz na distribuição gasosa. Porém, microaeradores são largamente empregados devido ao fato de que os poros médios geram bolhas ainda menores e mais uniformes, além de evitarem a formação de biomassa acumulada na superfície externa do aspensor (NAJAFPOUR, 2007).

Alguns exemplos acerca da utilização desses aspensores de gás encontrados na literatura são mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Desenhos esquemáticos de alguns exemplos de aspensores do gás



(A) Aspensor anelar com perfurações centrais; (B) bico de quatro orifícios; (C) aspensor anelar do tipo aranha com seis fendas; (D) bico de dois orifícios; (E) aspensor anelar com sete fendas paralelas; (F) aspensor anelar com três anéis centrais concêntricos; (G) aspensor anelar.

Fonte: adaptado de Luo *et al.* (2011) e Kulkarni *et al.* (2009).

Rocha-Valadez *et al.* (2000) avaliaram a influência da configuração de impelidores e aeradores sobre o crescimento de *Trichoderma harzianum* quando mantido constante o percentual de oxigênio dissolvido no meio. Os impelidores utilizados foram do tipo Rushton ($D = 0,49T$) e do tipo hélice ($D = 0,65T$) e os aspensores foram de cinco orifícios ($D_{\text{orifício}} = 1\text{mm}$), anel perfurado de oito orifícios ($D_{\text{orifício}} = 0,8\text{mm}$) e anel sinterizado ($D_{\text{poros(médio)}} = 20\mu\text{m}$). Ao utilizar um aspensor de cinco orifícios e a configuração de dois impelidores do tipo Rushton, a área interfacial gás-líquido e o *gas hold up* foram inferiores às outras configurações utilizadas. Nesta configuração, os autores obtiveram os menores valores de $K_L a$, possivelmente devido ao maior diâmetro dos orifícios do aspensor. Por outro lado,

quando utilizados um aspersor anel sinterizado e a configuração de impelidores de um impelidor do tipo Rushton e uma do tipo hélice, melhores resultados em termos de K_{La} foram determinados.

Luo *et al.* (2011) investigaram o efeito da configuração de três aspersores de gás (bocal de dois orifícios, bocal de quatro orifícios e anel perfurado) sob diferentes parâmetros hidrodinâmicos e de transferência de massa. Os ensaios foram realizados em biorreator do tipo *airlift* de circulação interna. Os autores concluíram que aspersores com menor diâmetro e maior número de orifícios influenciaram positivamente no processo de transferência de massa gás-líquido, pois a aspersão do gás gerou bolhas de menor diâmetro, melhorando a velocidade de circulação do líquido e sendo possível determinar valores de K_{La} superiores.

3.6 IMPELIDORES E CORRENTES DE FLUXO

Assim como os aspersores de gás, os impelidores também são importantes no processo de transferência de massa gás-líquido. A mistura proporcionada por esses agitadores cria certa uniformidade das bolhas de gás dentro do reator. Quando utilizados em conjunto – geralmente em processos fermentativos – são responsáveis por assegurar a distribuição do gás por todo o equipamento. Todavia, podem causar altas forças de cisalhamento e possível ruptura das células microbianas. Nesse caso, configurações especiais de impelidores são necessárias para garantir a integridade das células (PUTHLI *et al.*, 2005; NAJAFPOUR, 2007).

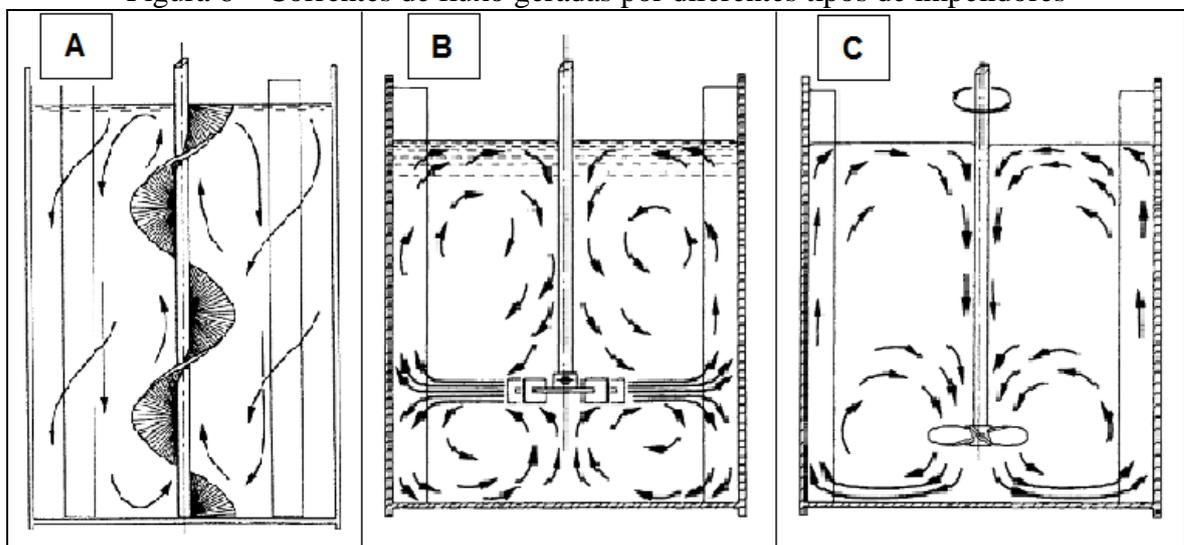
A direção e a magnitude da velocidade da mistura são críticos em sistemas com agitação mecânica. A direção dos vetores de velocidade e sua magnitude em fluidos viscosos e em regime turbulento são constantes. Na literatura, são comumente conhecidos como correntes de fluxo. Essas correntes são responsáveis pela mistura e dependem do tipo de impelidor utilizado, de modo a evitar, principalmente, a formação do vórtice central, prejudicial à transferência de oxigênio, podendo ser evitada pela utilização de chicanas, sem interferir nas correntes tanto longitudinais quanto radiais (COKER, 2001).

As correntes de fluxo geradas por alguns impelidores são ilustradas na Figura 6. No Quadro 4 estão ilustrados impelidores largamente utilizados na indústria, suas aplicabilidades e correntes de fluxo geradas. De modo geral, correntes de fluxo radiais são ideais para dispersão de fluidos – as quais necessitam altos níveis de cisalhamento. Correntes de fluxo

axiais são mais adequadas em operações de mistura, suspensão de sólidos e transferência de calor (COKER, 2001).

Fasano *et al.* (1994) destacam as diferenças entre os tipos de fluxo provocados por impelidores de pás retas e de pás inclinadas. Também destacam a influência do emprego destes misturadores em processos industriais. Kumaresan e Joshi (2006) explicam que as correntes de fluxo, juntamente com o número de potência, estão diretamente relacionadas com o ângulo, número, espessura e comprimento das pás do impelidor, bem como com a direção de bombeamento do fluido e a interação do próprio fluxo com as paredes do tanque.

Figura 6 – Correntes de fluxo geradas por diferentes tipos de impelidores

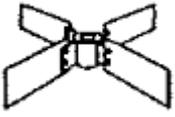
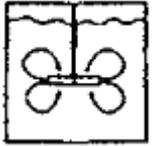
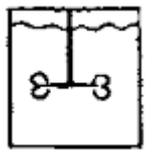
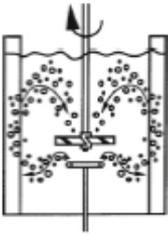
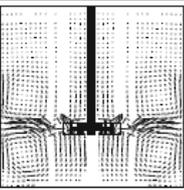
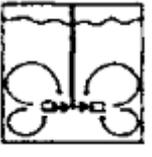
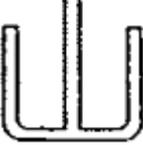
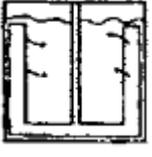


(A) Impelidor do tipo parafuso helicoidal e reator contendo chicanas; (B) correntes de fluxo radiais produzidas por impelidor de pás retas planas; (C) correntes de fluxo axiais produzidas por impelidor do tipo hélice marítima.

Fonte: adaptado de Holland e Bragg (1995)

O sistema de agitação mecânica proporcionado pela utilização de dois impelidores do tipo Rushton de 19cm de diâmetro foi estudado por Xinhong *et al.* (2008). Os autores concluíram que as correntes de fluxo geradas por esses impelidores dependem do espaçamento entre o impelidor inferior e o fundo do tanque, entre os dois impelidores e entre o impelidor superior e a superfície do líquido, formando combinações de escoamento de fluxo denominadas paralelas, emergentes e divergentes.

Quadro 4 – Impelidores, correntes de fluxo e suas aplicações na indústria

Impelidor	Correntes de fluxo	Nome	Aplicações
		Turbina de pás retas	Mistura e dispersão de líquidos
		ChemShear (turbina de pás estreitas)	Dispersões líquido-líquido e sólido-líquido Cisalhamento local
		Turbina de pás inclinadas	Mistura Suspensão Dispersão de sólidos Transferência de calor Movimento de superfície
		Turbina de pás retas (Rushton)	Dispersão de gases Fluxo de gás baixo e intermediário Dispersão líquido-líquido
		Turbina de pás côncavas (Smith)	Dispersão de gases Fluxo de gás intermediário e alto
		Âncora	Transferência de calor em meios viscosos

Fonte: adaptado de Myers *et al.* (1996) e Doran (2013)

3.6.1 Classificação dos impelidores

3.6.1.1 Impelidores Rushton

Por suas características, seu estudo detalhado e sua eficiência na dispersão de gases, os impelidores de seis pás planas, também conhecidos como impelidores Rushton, têm sido empregados em fermentações industriais desde a década de 50. Apesar de serem frequentemente utilizados diâmetros desses impelidores equivalentes a 1/3 do diâmetro do fermentador, também tem sido estudadas geometrias superiores, as quais beneficiam a distribuição de gás e mistura do fluido (DORAN, 2013).

Em estudo comparativo envolvendo o desempenho de impelidores Rushton e de pás retas inclinadas, Sardeing *et al.* (2004) inferiram que, ao se utilizar impelidores Rushton, a transferência de massa é incrementada, visto que o K_{La} é função da potência consumida. Assim, dissipam mais potência que os outros impelidores estudados, além dessa energia ser utilizada para a quebra das bolhas e para o melhoramento dos efeitos de turbulência no sistema.

O processo de produção de lipases de *Geotrichum candidum* foi estudado por Maldonado *et al.* (2012). Os autores utilizaram agitadores dos tipos Rushton, pás retas inclinadas e hélices, cujos ensaios resultaram nas mais altas atividades enzimáticas de 18,92U/mL, 12,14U/mL e 21,27U/mL, respectivamente, para cada tipo de impelidor. Entretanto, a produtividade mais elevada (0,65U/mL/h) foi atingida quando utilizadas impelidores Rushton.

3.6.1.2 Impelidores *pitched blade*

Também conhecidas como impelidores de pás retas inclinadas, esses impelidores geram componentes de velocidade do fluido nas direções tanto axial como radial devido ao ângulo de inclinação das pás. Quando comparadas com impelidores Rushton, apresentam superior capacidade de bombeamento do líquido, o que as tornam excelentes para alguns processos de mistura, além de ser possível utilizá-las para o bombeamento no sentido ascendente ou descendente (DORAN, 2013).

Queiroz (2009) destaca que o ângulo de inclinação das pás dos impelidores tipo *pitched blade*, em relação ao eixo vertical, tem influência na potência requerida pelo sistema, concluindo que quanto maior o ângulo de inclinação, menor a potência requerida.

Jirout e Rieger (2011) analisaram o desenho de impelidores e seu efeito na agitação e mistura de suspensões de partículas sólidas. Cada *pitched blade* utilizada apresentava três pás planas inclinadas, com ângulo de inclinação de 24°, 35° e 45°. Também foram empregados impelidores tipo hélice e pás inclinadas e dobradas diagonalmente. Os autores relataram que,

entre os vários impelidores testados, maior energia para obter uma suspensão homogênea foi requerida com o uso de impelidores tipo *pitched blade* com inclinação de 45° e três pás planas inclinadas. Além disso, apontaram que esse tipo de impelidor age de maneira pouco eficiente em regiões onde as partículas são relativamente pequenas.

Fořt (2011) analisou as propriedades de impelidores *pitched blade* e destacou que a efetividade do fluxo é incrementada significativamente com a redução do ângulo e com a razão do diâmetro do impelidor pelo diâmetro do biorreator. O fluxo foi favorecido com a utilização de pás de 45° com razão 1/3 entre o diâmetro do impelidor e o diâmetro do biorreator.

A influência de configurações de impelidores Rushton e *pitched blade* de 3 pás no cultivo de *Aspergillus glaucos* foi retratada por Cai *et al.* (2011), que demonstraram que a combinação de um impelidor Rushton no fundo de reator e uma *pitched blade* no topo favoreceu a obtenção de biomassa. A produção de metabólitos, todavia, foi superior com a utilização de dois impelidores *pitched blade*.

3.6.2 Velocidade na extremidade do impelidor

Wang *et al.* (1979) explanam que a velocidade na extremidade do impelidor (v_{tip}) está diretamente relacionada com a frequência de rotação e com o diâmetro do impelidor, além do cisalhamento máximo do microrganismo. Consequentemente, tem relação com o diâmetro médio das bolhas, com o tamanho dos *pellets* e com a viabilidade celular. Em termos de ampliação de escala para cultivos microbianos, em geral, estima-se que resultados satisfatórios podem ser obtidos em uma faixa de v_{tip} entre 250 a 500cm/s.

Rodríguez Porcel *et al.* (2005) analisaram o efeito da morfologia dos *pellets* de fungos filamentosos de *Aspergillus terreus* para a produção de lovastatina, em cultivos em leite fluidizado e em biorreator do tipo STR. Os autores relataram que a frequência dos agitadores teve influência no diâmetro dos *pellets*. À frequência dos agitadores máxima de 300rpm e à velocidade na extremidade do impelidor de 102cm/s (valor inferior quando comparado com os dados de Wang *et al.* (1979)), em ambos os sistemas de cultivo, a morfologia dos *pellets* manteve-se quase inalterada, com diâmetro equivalente a 2.300µm. Acima dessa frequência, características morfológicas distintas foram observadas.

3.7 TRANSPORTE DE OXIGÊNIO EM BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA

Neste subitem, serão apresentados aspectos acerca do transporte de oxigênio e sua relação com tópicos de mecânica de fluidos e sua importância para a avaliação de modelos empíricos encontrados na literatura quando variados parâmetros de processo como a vazão específica de gás e a potência do motor. O referencial teórico apresentado nos itens subsequentes foram, em sua maior parte, adaptados de Doran (2013) e Schmidell (2001) e autores referenciados nessas obras.

3.7.1 Potência requerida por fluidos Newtonianos sem aeração

Segundo Perry e Green (1984), a potência necessária para a agitação mecânica de fluidos Newtonianos não aerados depende da frequência de agitação dos impelidores, do tamanho e da forma dos mesmos, da massa específica e da viscosidade do fluido, bem como da geometria do tanque. Assim sendo, têm-se os números de Reynolds (Re) e de potência (N_p), que correlacionam essas variáveis, segundo as Equações 1 e 2, respectivamente:

$$Re = \frac{N \cdot D_i \cdot \rho}{\mu} \quad (1)$$

$$N_p = \frac{P}{N^3 \cdot D_i^5 \cdot \rho} \quad (2)$$

Onde:

Re : número de Reynolds [adimensional];

N_p : número de potência [adimensional];

N : frequência dos agitadores [s^{-1}];

D_i : diâmetros do impelidor [m];

ρ : massa específica do fluido [kg/m^3];

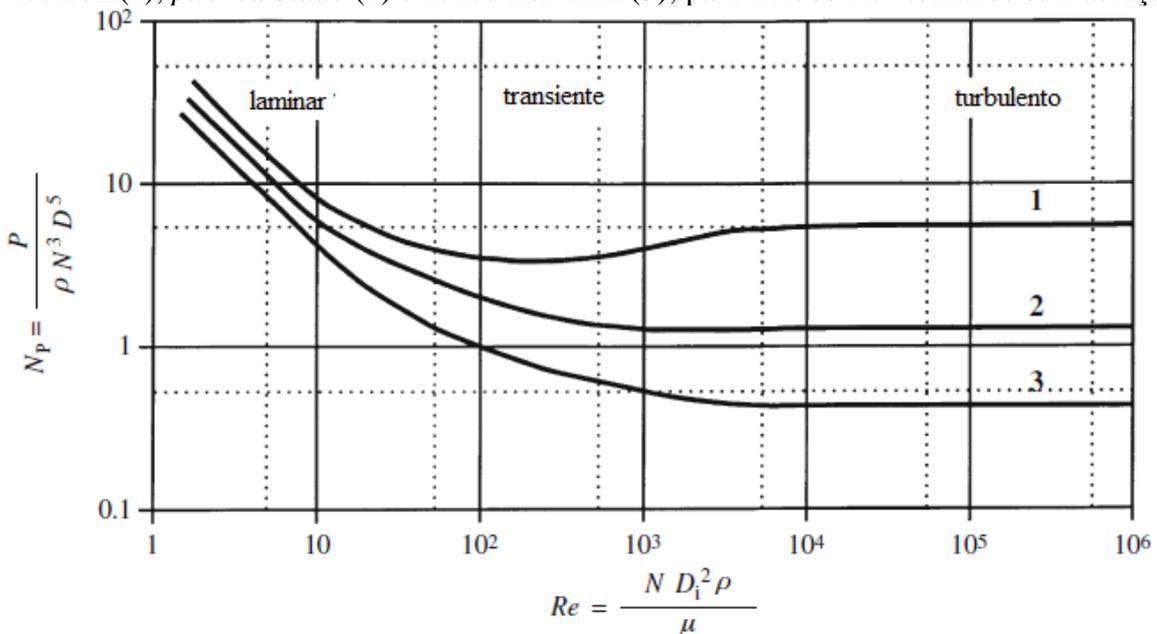
μ : viscosidade do fluido [$kg/m/s$].

Dependendo do tipo de impelidor utilizado, a relação entre Re e N_p é variável e condicionada ao tipo de regime (laminar, transiente ou turbulento) no biorreator (Figura 7). O

N_p para impelidores Rushton, principalmente no regime turbulento, é superior aos impelidores *pitched blade*, pois geram níveis mais altos de torque e, concomitantemente, sob mesma frequência dos agitadores com geometrias diferenciadas, transmitem maior potência ao fluido (PERRY; GREEN, 1984).

As curvas mostradas na Figura 7, todavia, estão correlacionadas com relações geométricas segundo a Tabela 1, na qual são mostradas as relações existentes para os casos de impelidores Rushton (1) e *pitched blade* (2), utilizados neste trabalho. As mesmas relações são frequentemente readaptadas e modificadas, dependendo da geometria espacial do biorreator. Doran (2013), por exemplo, relata estudos com a utilização de impelidores Rushton e valores de N_p para regime turbulento diferentes daqueles mostrados na Figura 7, bem como relações geométricas distintas daquelas expostas na Tabela 1.

Figura 7 – Número de potência em função do número de Reynolds para impelidores dos tipos Rushton (1), *pitched blade* (2) e hélice marítima (3), para fluidos Newtonianos sem aeração



Fonte: adaptado de Doran (2013)

Tabela 1 – Relações geométricas para impelidores dos tipos Rushton e *pitched blade* que validam as curvas de número de potência em função do número de Reynolds

Tipo de impelidor e relações geométricas	D_i/D_t	H_L/D_t	C_i/D_t	Chicanas	
				W_{BF}/D_t	Nº
Impelidor tipo Rushton					
$W_B/D_i = 0,2$	0,33	1	0,33	0,1	4
$L_B/D_i = 0,25$					
Impelidor tipo <i>pitched blade</i>					
$W_B/D_i = 0,125$	0,33	1	0,33	0,1	4
6 pás a 45°					
Bombeamento descendente					

D_t : diâmetro do tanque; W_B : altura da pá do impelidor; L_B : largura da pá do impelidor; H_L : altura do fluido; W_{BF} : largura da chicana; C_i : altura desde o centro do impelidor até o fundo do tanque.

Fonte: adaptado de Doran (2013)

Schmidell (2001) explana que frequentemente não é possível calcular a potência transmitida para biorreatores com geometria distinta. Por isso, é proposto multiplicar a potência por um fator de correção (f_c), caso as proporções H_L/D_i e D_T/D_i sejam diferentes de 3 (Equação 3).

$$f_c = \frac{\sqrt{(H_L/D_i)(D_T/D_i)}}{3} \quad (3)$$

Onde:

f_c : fator de correção [adimensional].

3.7.2 Potência requerida por fluidos Newtonianos sob aeração

A potência necessária para a agitação mecânica de fluidos Newtonianos aerados é inferior àquela demandada pelo sistema sem aeração (MICHEL; MILLER, 1962). Para calculá-la, algumas relações empíricas encontradas na literatura são descritas a seguir.

Michel e Miller (1962) propuseram que a potência requerida por fluidos Newtonianos aerados fosse calculada conforme a Equação 4. Os dados adquiridos pelos autores foram calculados tendo por base um tanque de 12 polegadas de diâmetro e impelidor

de 4 polegadas de diâmetro, em diferentes fluidos (água, tetracloreto de carbono, óleo mineral e soluções de glicerina).

$$P_g \propto \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (4)$$

Onde:

P_g : potência com aeração [HP];

P_o : potência sem aeração [HP];

N : frequência do impelidor [min^{-1}];

$D = D_i$: diâmetro do impelidor [cm];

Q : vazão de ar [L/min].

Logo, chega-se a Equação 5.

$$P_g = c \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (5)$$

Onde:

c : constante [adimensional].

Os autores explicam que a constante c depende da geometria do impelidor. Como exemplo, Michel e Miller (1962) utilizaram dados da literatura para cálculos com impelidores de pás retas e determinaram valor de 0,8 para c , desde que as unidades fossem em HP, min^{-1} , ft e ft^3/min para P_o , N , D e Q , respectivamente.

Posteriormente, Miller (1974), seguindo as recomendações de Michel e Miller (1962), definiu a seguinte expressão (Equação 6).

$$P_g = 0,706 \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (6)$$

Onde:

P_g : potência com aeração [W];
 P_o : potência sem aeração [W];
 N : frequência do impelidor [s^{-1}];
 $D = D_i$: diâmetro do impelidor [m];
 Q : vazão de ar [m^3/s].

Schmidell (2001) utilizou dados de Wang *et al.* (1979) e redefiniu a Equação 5 para fluidos com comportamento Newtoniano (Equação 7) e não-Newtoniano (Equação 8).

$$P_g = 0,545 \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,48} \quad (7)$$

$$P_g = 0,405 \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,44} \quad (8)$$

Badino Jr. *et al.* (2001) estimaram o valor de P_g por meio da correlação tradicional de Michel e Miller (1962) (Equação 4) e obtiveram a Equação 9. Os dados referem-se a cultivos de *Aspergillus awamori* em bateladas envolvendo fluidos não-Newtonianos.

$$P_g = 0,832 \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,44} \quad (9)$$

De qualquer forma, a Equação 4 e todas subsequentes, derivadas dela, são semelhantes e de grande valia para o entendimento acerca do sistema de agitação em biorreatores de agitação mecânica.

3.7.3 Modelagem empírica para determinação do suprimento de oxigênio em biorreatores sob aeração e agitação mecânica

Na literatura, existem muitas equações empíricas que relacionam o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) com as variáveis de processo. Além disso, também é comum encontrar modelos empíricos obtidos por certos autores que não se ajustam com dados obtidos por outros autores. Entretanto, a correlação mais utilizada, por vezes, não é

necessariamente aquela que se ajusta a uma pequena faixa de tamanho do tanque, mas aquela que satisfaça a maioria das variáveis estudadas e as observações feitas sobre aproximadamente quase todos esses parâmetros (RICHARDS, 1961).

Cooper *et al.* (1944) estudaram um método para avaliar as variáveis permanentes em tanques sob agitação. Foram medidos o consumo de potência do impelidor do tipo disco ranhurado (*vaned disk*) e a taxa de oxidação de uma solução aquosa de sulfito de sódio. O coeficiente volumétrico de absorção (K_v) mostrou-se variável em função da potência do impelidor (Equação 10) e da velocidade superficial do gás (Equação 11).

$$K_v = k \cdot P_v^{0,95} \quad (10)$$

$$K_v = k' \cdot v_s^{0,67} \quad (11)$$

Onde:

K_v : coeficiente volumétrico de absorção [lbmol/(ft³.h.atm)];

k, k' : constantes de proporcionalidade [adimensionais];

P_v : potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação [ft.lb/(min.ft³)];

v_s : velocidade superficial do gás baseado no volume de gás na entrada do tanque e a seção transversal do tanque [ft/h].

O $K_L a$ pode ser calculado a partir de K_v , conforme a Equação 12.

$$K_L a = K_v \cdot H \quad (12)$$

Onde:

$K_L a$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio [h⁻¹];

K_v : coeficiente de absorção [mmol O₂/(L.h.atm)];

H : constante de Henry [atm.L/mmol O₂].

Richards (1961), considerando os resultados de Cooper *et al.* (1944) como alguns dos mais detalhados já publicados à época, propôs, então, a Equação 13, adicionando o termo da frequência do impelidor, sem que houvesse problemas de ajustes aos dados já publicados.

$$K_L \alpha = k \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} (v_s)^{0,5} \cdot N^{0,48} \quad (13)$$

Onde:

$K_L \alpha$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio [mmol O₂/(L.h.atm)];

k : constante de proporcionalidade [adimensional];

P_g/V : potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação [HP/1000L];

v_s : velocidade superficial do ar [cm/min];

N : frequência do impelidor [min⁻¹].

Posteriormente, Wang *et al.* (1979), também considerando dados de Cooper *et al.* (1944), empregou um parâmetro adicional – o número de impelidores – correlacionando os dados quantitativos com o $K_L \alpha$, segundo a Equação 14. Empiricamente, foram determinados os valores das constantes α e δ como sendo 2,0 e 2,8, respectivamente.

$$K_L \alpha = (\alpha + \delta N_i) \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,77} (v_s)^{0,67} \quad (14)$$

Onde:

$K_L \alpha$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio [mmol O₂/(L.h.atm)];

α, δ : constantes de proporcionalidade [adimensionais];

P_g/V : potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação [HP/1000L];

v_s : velocidade superficial do ar [cm/min];

N_i : número de impelidores.

Schmidell (2001), utilizando as informações encontradas nas Equações 10 e 11, propôs a Equação 15. Para os dados de Cooper *et al.* (1944), então, obteve a Equação 16, desde que $H_L/D_T = 1$ e impelidor fosse do tipo disco ranhurado.

$$K_v = K_3 \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha (v_s)^\beta \quad (15)$$

$$K_v = 25,306 \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,95} (v_s)^{0,67} \quad (16)$$

Onde:

P_g/V : potência do impelidor por unidade de volume do líquido sob agitação [W/m^3];

K_3 : constante que depende da geometria do sistema, assim como do sistema de unidades empregado [adimensional];

v_s : velocidade superficial do ar [m/s];

α, β : constantes empíricas [adimensionais].

Baseado em dados da literatura acerca da produção de penicilina, Badino Jr. *et al.* (2001) explicam que as relações empíricas para determinar o $K_L a$, além de incorporarem termos como a frequência do impelidor (Equação 13), também podem sofrer a influência da viscosidade aparente do fluido (Equação 17). As unidades das variáveis, segundo seus relatos, não foram citadas.

$$K_L a = 19,89 \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,53} (v_s)^{0,43} (\mu_{ap})^{-0,12} \quad (17)$$

Onde:

μ_{ap} : viscosidade aparente do fluido.

Percebe-se que, dependendo do(s) autor(es), as unidades de medidas são distintas, bem como o método de determinação das medidas de $K_L a$. Badino Jr. *et al.* (2001), por exemplo, utilizaram o balanço gasoso para determinar as medidas de $K_L a$ em meio de fermentação (fluido não-Newtoniano). Wang *et al.* (1979) e autores mais remotos determinaram esse parâmetro por meio da utilização do método do sulfito, em fluidos Newtonianos. Portanto, para a análise e a avaliação da modelagem empírica para determinação do suprimento de oxigênio em biorreatores sob aeração e agitação mecânica, deve-se levar em conta esses detalhes.

Tendo em vista os relatos apresentados, nota-se uma forte influência da configuração do biorreator para o transporte de oxigênio, de modo a facilitar a produção de pectinases

fúngicas. Da mesma forma, faz-se necessária uma correta utilização de aspersores de gás e de impelidores que facilitem a análise de processos aeróbios com fungos filamentosos, tais como *A. oryzae*, utilizado neste trabalho. Além disso, sabendo que esses microrganismos demandam altas concentrações de oxigênio para seu metabolismo celular, ainda que largamente estudados, seu comportamento em processos para produção enzimática ainda não foram totalmente compreendidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E MEIOS DE CULTIVO

O microrganismo utilizado em ensaios sobre a produção de pectinases foi *Aspergillus oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo, capaz de produzir extratos enzimáticos pectinolíticos (FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA; SILVEIRA, 2012). Para a conservação e propagação do microrganismo foi utilizado o meio de cultura descrito por Maiorano (1982), com a composição, em g/L: glicose, 25; glicerina, 25; extrato de levedura, 5 e ágar nutriente, 20. A incubação foi realizada em estufa a 30°C, por 96 horas.

O meio de fermentação utilizado para a produção enzimática foi descrito por Meneghel *et al.* (2012), cuja composição, em g/L, foi: extrato de farelo de trigo (Moinho NORDESTE, Antônio Prado, Brasil), 40; pectina cítrica (USP-B CPKelco, Limeira, SP, Brasil), 20; extrato de levedura, 0,05; glicose, 5; (NH₄)₂SO₄, 5; MgSO₄, 0,5; KH₂PO₄, 2,5; FeSO₄.7H₂O, 6,3.10⁻⁴; ZnSO₄, 6,2.10⁻⁴ e MnSO₄, 1.10⁻⁵. O pH do meio foi ajustado em 4 com a adição de NaOH 2,5mol/L ou HCl 2mol/L e o meio foi esterilizado em autoclave, a 1atm, por 15 minutos.

O meio de fermentação formulado com pectina desesterificada foi preparado a partir de uma solução aquosa de pectina na concentração inicial de 46,6g/L. Em seguida, o pH dessa solução foi corrigido para 10 com a adição de NaOH 5mol/L, deixado sob agitação até estabilização do pH em 8,7 e, posteriormente, foi adicionado HCl 2mol/L até atingir o valor de pH 4. Os demais componentes foram adicionados em seguida, conforme concentração já definida, inclusive mantendo-se a concentração final da pectina cítrica em 20g/L.

4.2 PREPARO DE INÓCULO

Em câmara de fluxo laminar, água previamente destilada foi adicionada às placas de Petri que continham a cultura microbiana. Com o auxílio de uma alça esterilizada, os esporos de *A. oryzae* foram recolhidos e transferidos para frascos Duran, também contendo água esterilizada. A concentração da suspensão foi definida por contagem em câmara de Neubauer e a inoculação do meio foi feita de forma a obter 10⁵ esporos por mL de meio no início do cultivo.

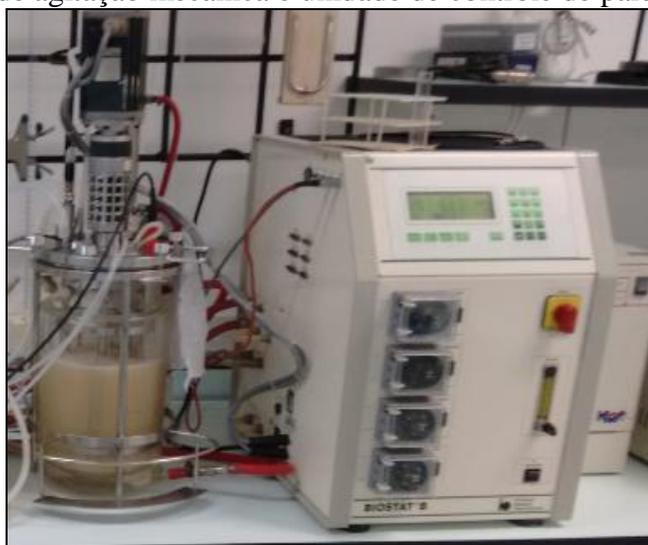
4.3 DETALHAMENTO DOS BIORREADORES

Os ensaios para produção de pectinases de *Aspergillus oryzae* foram realizados em biorreatores de bancada de agitação mecânica e *airlift*. Os detalhes dos processos e das condições de cultivo são apresentados na sequência.

4.3.1 Biorreator de agitação mecânica

Os ensaios foram conduzidos em biorreator de agitação mecânica B. Braun Biotech, modelo Biostat B (RFA) (Figura 8), cujo volume útil é de 5L e volume de trabalho utilizado nos testes de 3,5L. Este equipamento é composto por uma cuba de vidro de fundo arredondado e 4 defletores (chicanas) removíveis espaçadas a 90° entre si. A unidade de controle permite o monitoramento de parâmetros de processo, como fluxo de gás, percentual de oxigênio na saturação, temperatura e frequência dos agitadores.

Figura 8 – Reator de agitação mecânica e unidade de controle de parâmetros de processo



Algumas especificações geométricas importantes para cálculos posteriores envolvendo esse tipo de equipamento são mostradas na Tabela 2.

O sistema de agitação é composto por diferentes combinações de impelidores, dispostos em um eixo central, com selo mecânico, também acoplado à tampa do biorreator. Impelidores dos tipos Rushton e *pitched blade* a 45° (ambos de 62mm de diâmetro e contendo seis pás retas) (Figura 9) foram avaliados sob diferentes condições experimentais. Em todos os ensaios foram utilizados três impelidores, distanciados entre si (D) em 4,5cm. A disposição

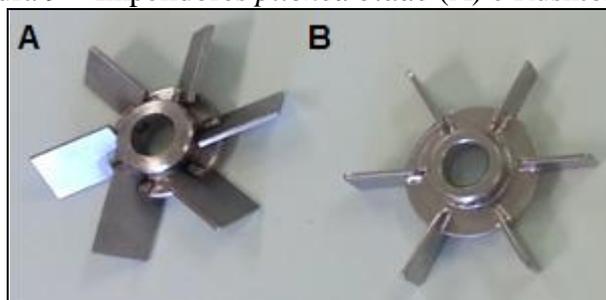
dos impelidores foi codificada conforme mostrado no Quadro 5. Essas escolhas foram tomadas devido à geração de correntes de fluxo distintas, como discutido no item 3.6.

Tabela 2 – Especificações geométricas do biorreator de agitação mecânica

Especificação geométrica	Sigla	Valor
Diâmetro do impelidor [cm]	D_i	6,2
Diâmetro do tanque [cm]	D_t	16,0
Altura da pá do impelidor [cm]	W_B	1,2
Largura da pá do impelidor [cm]	L_B	1,9 ⁽¹⁾ 2,2 ⁽²⁾
Altura do fluido [cm]	H_L	17,4 ⁽³⁾
Largura da chicana [cm]	W_{BF}	1,2
Altura desde o centro do impelidor inferior até o fundo do tanque [cm]	C_i	2,8
Altura total entre os impelidores [cm]	H_i	10,2 ⁽⁴⁾

(1) para impelidor Rushton; (2) para impelidor *pitched blade*; (3) Para 3,5L; (4) 2x4,5cm (entre os impelidores) + 1. W_B .

Figura 9 – Impelidores *pitched blade* (A) e Rushton (B)



Quadro 5 – Codificações das configurações de impelidores utilizadas nos ensaios em biorreator de agitação mecânica

Codificação	Significado
R R R	Utilização de três impelidores do tipo Rushton
PB PB PB	Utilização de três impelidores do tipo <i>pitched blade</i>
R PB PB	Utilização de um impelidor do tipo Rushton (inferior) e dois impelidores do tipo <i>pitched blade</i> (superiores)

A temperatura foi mantida em 28°C por meio de um banho termostático conectado à camisa de refrigeração da cuba do reator. O pH era controlado por meio de uma sonda calibrada a partir do sistema de controle do equipamento. Duas bombas peristálticas

permitiam a adição de HCl 2,0mol/L ou NaOH 2,5mol/L, além de registrar o volume adicionado de cada reagente.

Uma sonda polarográfica de oxigênio dissolvido, calibrada no meio de cultivo após sua esterilização, permitia o controle das concentrações de oxigênio dissolvido no meio, expresso em percentual de saturação.

A aeração foi proporcionada pelo acessório padrão do próprio reator ou, alterativamente, por um tubo de aço inoxidável ao qual foram acoplados dois tipos diferentes de aspersores de gás. O tubo era fixado à tampa e prolongado até o fundo do biorreator para aspergir o gás de modo ascendente. A distância do aerador até o fundo do tanque era de aproximadamente 15mm. Os aspersores de gás utilizados foram: aerador do tipo pedra sinterizada, de 20mm de diâmetro e 30mm de comprimento; ferradura de aço inoxidável (padrão do equipamento), de tubulação de 5mm de diâmetro e 60mm de diâmetro do aerador; e aerador de aquário, de 10mm de diâmetro e 40cm de comprimento, fabricado em borracha polimérica (Figura 10).

Figura 10 – Aspersores de gás utilizados nos ensaios em biorreator de agitação mecânica



(A) aerador tipo pedra sinterizada; (B) ferradura de aço inoxidável; (C) aerador de aquário

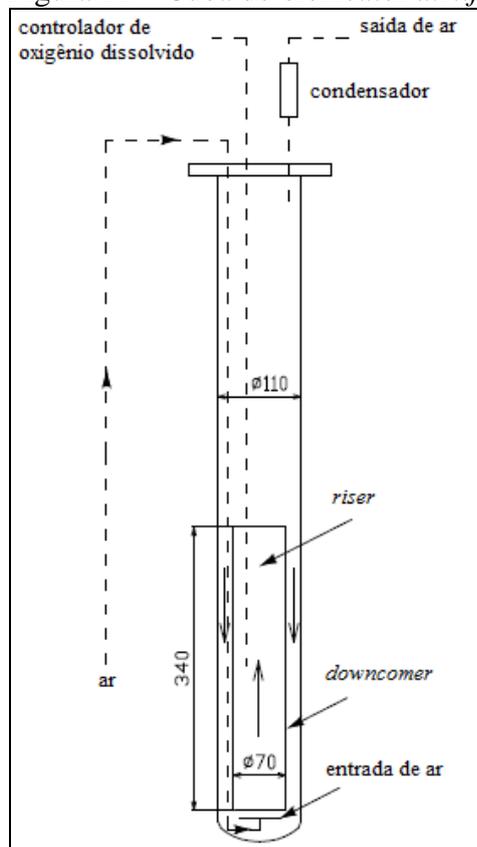
A retirada das amostras e a inoculação do meio eram feitas com o auxílio de uma bomba peristáltica. Uma mangueira de silicone era conectada a um tubo de aço inoxidável de extremidade localizada próximo ao fundo da cuba do reator e possibilitava a circulação do meio, em circuito fechado.

4.3.2 Biorreator *airlift*

Os ensaios em biorreator *airlift* foram realizados em sistema *airlift* de circulação interna (Figura 11), construído em vidro refratário. Os tubos internos e o tubo externo, também construídos em vidro refratário, seguem dimensionamento mostrado na Tabela 3. A

circulação do fluido era garantida através da aspersão do gás influente – por meio do aspersor de gás – na região interna do tubo interno, ascendendo por essa região, e passando pelo *downcomer* (região de descida do gás e do fluido).

Figura 11 – Cuba do biorreator *airlift*



Fonte: adaptado de Fontana *et al.* (2009)

Tabela 3 – Dimensionamento dos tubos do *airlift*

Dimensão	Tubo interno 1	Tubo interno 2	Tubo externo
Diâmetro interno [mm]	50	64	106
Diâmetro externo [mm]	54	70	110
Espessura da parede [mm]	2	3	2
Altura [mm]	340	340	750

A tampa do biorreator foi construída em material polimérico cedido pelo Laboratório de Polímeros (LPOL), da Universidade de Caxias do Sul, que se acopla a quatro hastes verticais de aço inoxidável, que, por sua vez, são fixadas na base construída em *nylon*. Perfurações foram feitas para a passagem de eletrodos de controle de pH e oxigênio dissolvido, sensor de temperatura e demais tubulações.

O controle da temperatura, em 28°C, foi feito por meio de um banho termostatizado conectado a um tubo na forma de um “U”, fabricado em aço inoxidável, fixado na tampa do reator. Uma sonda polarográfica de oxigênio dissolvido, acoplada ao sistema de controle (Mettler Toledo Transmitter M300) e calibrada no meio de cultivo, permitia as medições do percentual de oxigênio dissolvido e da temperatura do meio de cultivo.

O pH era controlado por meio de uma sonda calibrada a partir de um sistema de controle externo (Provitec Série DM). Duas bombas peristálticas permitiam a adição de ácido e base (HCl 2,0mol/L e NaOH 2,5mol/L) e, por meio de uma bureta, era possível registrar o volume adicionado de cada solução.

O sistema de aeração, semelhante ao descrito para o reator de agitação mecânica, consistiu de um tubo de aço inoxidável, ao qual foram acoplados diferentes tipos de aspersores de gás. Os aspersores de gás utilizados foram: aerador do tipo pedra sinterizada, aerador de aquário (Figura 10), aerador de latão e funis sinterizados de diâmetro (ϕ) 4cm e ϕ = 5cm (Figura 12).

Figura 12 – Aspersores de gás utilizados nos ensaios em biorreator *airlift*



(A) aerador de latão, (B) funil sinterizado ϕ = 4cm, (C) funil sinterizado ϕ = 5cm

A retirada das amostras e a inoculação do meio foram realizadas de forma semelhante à usada no sistema STR.

4.4 PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS RELATIVOS À TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

Os estudos sobre a transferência de oxigênio, avaliada em biorreatores de agitação mecânica (Figura 13) e *airlift* (Figura 14) seguiram os diagramas esquemáticos dos testes mostrados nessas figuras.

Os fluidos (água destilada e soluções de pectina em concentrações variadas), em biorreator de agitação mecânica, foram avaliados sob diferentes frequências dos agitadores e vazões volumétricas de gás (transformadas em vazões específicas de gás). Os dados foram avaliados em função da transferência de oxigênio, na forma detalhada a seguir, e das correlações empíricas para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).

Os fluidos (água destilada e soluções de pectina), em *airlift*, foram avaliados sob diferentes vazões volumétricas de gás – transformadas em vazões específicas de gás – volumes de fluido e aspersores de gás. A água destilada foi avaliada quanto ao tempo e à velocidade de circulação dentro do reator; a solução de pectina 2%(m/v) foi avaliada quanto ao tempo de circulação somente, devido à dificuldade em se obter dados para possíveis cálculos de velocidade de circulação.

Figura 13 – Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica

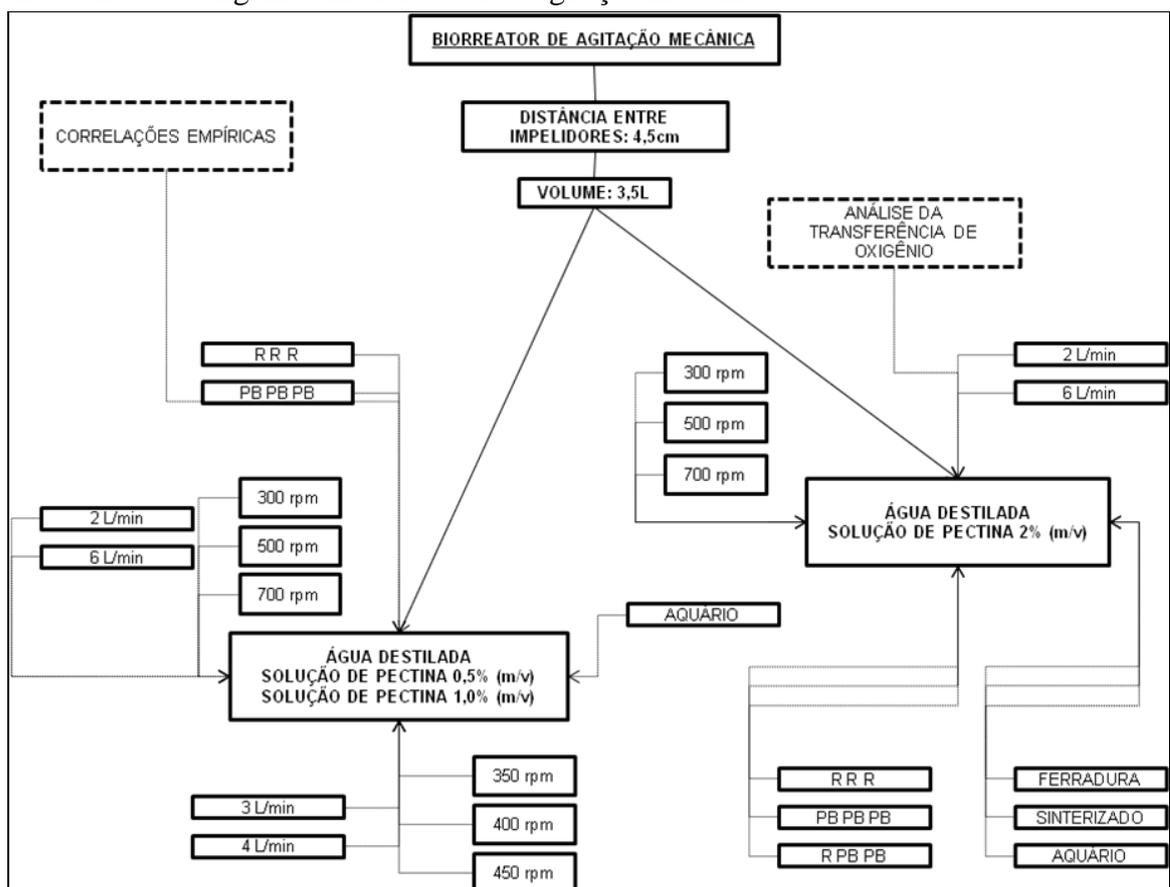
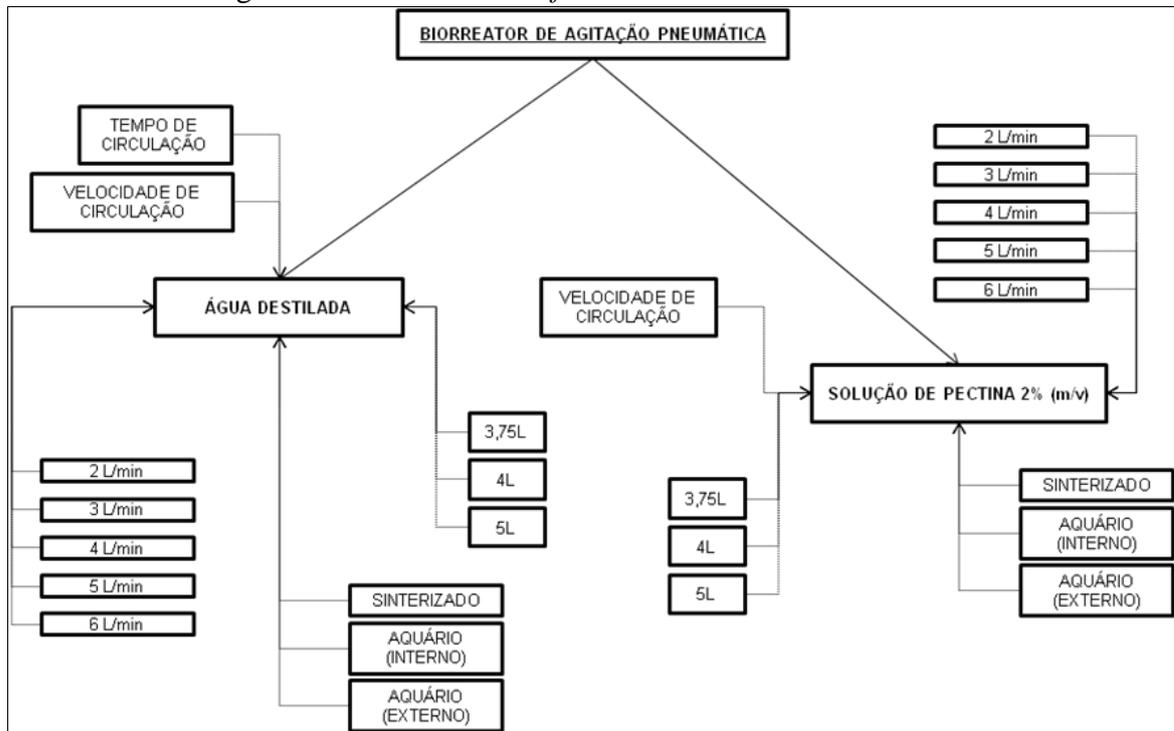


Figura 14 – Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator *airlift*



4.4.1 Análise da transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica

Visando melhorar a análise dos dados e estudar os parâmetros envolvidos no processo de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica, foi utilizada a ferramenta analítica de planejamento fatorial, por meio de diferentes tipos de planejamento. Os ensaios foram realizados randomicamente e os dados foram analisados com o auxílio do programa computacional Minitab 16W, com 95% de confiança.

Nestes ensaios, foi avaliada a influência do tipo de fluido, impelidor, aspersor de gás, frequência dos impelidores e vazão de gás sobre o $K_L a$. Foi utilizado um planejamento fatorial completo do tipo 2^5 , em duplicata, sem ponto central e em bloco único, totalizando 64 ensaios que foram realizados randomicamente. A codificação dos níveis (alto (+1) e baixo (-1)) seguiu o apresentado na Tabela 4.

Na Tabela 5 é mostrada a matriz com os dados codificados e variáveis obtida com o auxílio do programa Minitab 16W.

Tabela 4 – Variáveis e codificação dos níveis para análise do processo de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica

Variáveis controláveis	Codificação	
	(-1)	(+1)
Fluido (A)	Água (Ag)	Solução de pectina 2%(m/v) (P)
Impelidor (B)	Rushton (R)	<i>Pitched blade</i> (PB)
Aspersor (C)	Ferradura (F)	Aquário (Aq)
Frequência [rpm] (D)	300	700
Vazão [L/L/min] (E)	0,57	1,71

Tabela 5 – Matriz com os dados codificados e variáveis para análise do processo de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica

Ensaio	Fluido	Impelidor	Aspersor	Frequência [rpm]	Vazão [L/L/min]
1	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
2	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
3	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
4	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
5	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
6	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
7	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
8	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
9	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
10	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
11	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
12	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
13	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
14	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
15	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
16	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
17	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
18	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
19	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
20	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)

21	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
22	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
23	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
24	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
25	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
26	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
27	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
28	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
29	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
30	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
31	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
32	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
33	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
34	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
35	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
36	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
37	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
38	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
39	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
40	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
41	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
42	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
43	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
44	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
45	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
46	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
47	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
48	-1 (Ag)	+1 (PB)	+1 (Aq)	+1 (700)	-1 (0,57)
49	-1 (Ag)	-1 (R)	(-1)	+1 (700)	-1 (0,57)
50	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
51	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
52	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)

53	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	-1 (300)	-1 (0,57)
54	-1 (Ag)	-1 (R)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
55	-1 (Ag)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
56	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
57	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)
58	+1 (P)	+1 (PB)	+1 (Aq)	-1 (300)	+1 (1,71)
59	-1 (Ag)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
60	+1 (P)	-1 (R)	+1 (Aq)	+1 (700)	+1 (1,71)
61	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	-1 (300)	+1 (1,71)
62	+1 (P)	-1 (R)	-1 (F)	-1 (300)	-1 (0,57)
63	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	-1 (0,57)
64	+1 (P)	+1 (PB)	-1 (F)	+1 (700)	+1 (1,71)

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.5.1 Coleta e amostragem

O volume de amostras retiradas nos ensaios fermentativos foi de 10 a 15mL. A alíquota foi centrifugada em rotor de 9cm de diâmetro, a 10.000rpm por 10 minutos, em tubos Eppendorf (modelo 1-13, Alemanha). O sobrenadante foi armazenado sob refrigeração para posterior quantificação de açúcares redutores e atividade enzimática. A biomassa foi separada para a determinação da concentração celular.

4.5.2 Açúcares redutores e açúcares redutores totais

Os açúcares redutores (AR) foram analisados pelo método do ácido 3,5 di-nitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). Os sobrenadantes obtidos da coleta das amostras foram diluídos em água destilada de acordo com tempo de cultivo. Em tubo de ensaio, adicionou-se 0,25mL dessas amostras, juntamente com 0,75mL da solução de reagente. Uma amostra padrão foi preparada substituindo-se o volume da amostra diluída por água destilada. Os tubos foram colocados em banho a 100°C por 5 minutos. Após resfriados em banho de gelo, para interromper a reação química, 4mL de água destilada foram adicionados à reação. Soluções de glicose entre 0,1 e 1g/L foram preparadas para a construção da curva de calibração

padrão. Ambas as preparações e as soluções de glicose foram submetidas à leitura espectrofotométrica (PG Instruments, EUA), a 545nm, e os valores de absorbância lidos foram convertidos em gramas de glicose por litro de meio.

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados a partir da hidrólise ácida das amostras e posterior quantificação pelo método DNS (MENEGHEL, 2013). Similarmente ao método para quantificação de AR, inicialmente as amostras foram diluídas em água destilada de acordo com tempo de cultivo. Em tubo de ensaio eram adicionados 1mL da amostra diluída e 1mL de HCl 2,0M para submeter a amostra à hidrólise ácida. Uma amostra padrão foi preparada substituindo-se o volume da amostra diluída por água destilada. Os tubos eram colocados em banho a 100°C por 10 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 2,5mL de NaOH 1,0M para neutralização da reação e 0,5mL de água destilada. As preparações foram submetidas à leitura espectrofotométrica (PG Instruments, EUA), a 545nm, e os valores de absorbância lidos eram convertidos em gramas de glicose por litro de meio.

4.5.3 Concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada por gravimetria. A biomassa obtida na centrifugação das amostras, previamente livre de sobrenadante, era submetida a filtração a vácuo em papel filtro Whatmann nº 1, previamente seco em estufa a 80°C por 20 minutos. Para garantir que a biomassa estivesse livre de sólidos do meio aderidos a ela, foram realizadas lavagens com água destilada. Em seguida, as amostras filtradas foram colocadas em estufa a 80°C por 24 horas, resfriadas em desumidificador e pesadas para quantificação de células secas, segundo a Equação 18.

$$\text{concentração celular } \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{\text{massa de células secas} - \text{massa do filtro seco } [g]}{\text{volume de amostra } [L]} \quad (18)$$

4.5.4 Atividade de pectinases

A atividade de pectinases foi avaliada pelo método proposto por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi (2000), que se baseia na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina cítrica 0,63%(m/v), em tampão acetato 0,05mol/L, pH 4,0. Vale

ressaltar que os resultados apresentados nessa dissertação referem-se à quantificação da atividade de pectinases totais, apesar de, em trabalhos anteriores (MALVESSI; SILVEIRA, 2004; FONTANA *et al.*, 2009), este método estar relacionado à quantificação da atividade de endopoligalacturonases (endo-PG).

A solução tampão acetato 0,05M foi preparada a partir de três soluções: ácido acético (3g do ácido PA/100mL de água destilada); acetato de sódio trihidratado (6,83g do sal/100mL de água destilada) e benzoato de sódio (10g do sal/100mL de água destilada).

Em seguida, 73,6mL da solução (a), 26,4mL da solução (b) e 2,5mL da solução (c) foram misturadas e o volume completado para 1L de água destilada. O pH, então, foi corrigido para 4,0 com ácido acético PA.

A solução padrão de pectina cítrica 0,63%(m/v) foi preparada com 100mL da solução tampão, descrita acima, e posterior adição de 0,63g de pectina, sendo mantida sob agitação por 12 horas.

A aplicação do método se iniciava com o controle da temperatura da solução de pectina em banho termostático a 30°C e preparação de uma amostra padrão contendo o extrato enzimático inativado por exposição à temperatura de 100°C por 30 minutos. Em tubos de ensaio foram adicionados 3,2mL do sobrenadante das amostras contendo o extrato enzimático previamente diluído, juntamente com 14,8mL da solução de pectina. A mistura foi mantida a 30°C por 30 minutos. Em seguida, a viscosidade da solução foi medida em viscosímetro Brookfield modelo LVDV-II+, a 60rpm.

O percentual de redução da viscosidade (A) era calculado segundo a Equação 19.

$$A [\%] = \frac{\text{viscosidade da amostra inativada} - \text{viscosidade da amostra}}{\text{viscosidade da amostra inativada}} \times 100 \quad (19)$$

Os valores de A eram relacionados com a atividade de pectinases. Para isso, curvas padrões eram construídas a partir de diluições (de 1 até 500 vezes) do sobrenadante obtido ao final de cada cultivo. Uma proporção da concentração enzimática foi relacionada com a construção das curvas dos valores de A *versus* o logaritmo decimal do inverso das diluições. Uma unidade de pectinases totais (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a viscosidade do extrato, em condições padronizadas. As demais unidades, então, foram calculadas proporcionalmente e uma nova curva foi plotada relacionando A com

o logaritmo decimal de U . A linearização dessa curva permitiu o cálculo da atividade de pectinases (P), conforme a Equação 20.

$$P = 10^{\frac{A-a}{b}} \times \frac{dil}{v} \quad (20)$$

Onde:

P : atividade de pectinases [U/mL];

a : coeficiente linear da curva de calibração;

b : coeficiente angular da curva de calibração;

dil : diluição do extrato enzimático;

v : volume do preparado enzimático [mL].

4.6 CÁLCULO DE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

4.6.1 Velocidade específica de crescimento celular

A determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ_x), em h^{-1} , foi realizada a partir da derivação da curva dos valores de concentração celular em função do tempo de cultivo, $X = f(t)$, a qual representava as velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt) em função do tempo. Então, para o cálculo de μ_x , dividiu-se dX/dt pela concentração celular (X) no mesmo tempo de cultivo (Equação 21).

$$\mu_x = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (21)$$

4.6.2 Fatores de produção e conversão e de produtividade do processo

Os fatores de produção específica ($Y_{P/X}$), conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foram calculados pelas Equações 22, 23 e 24, respectivamente.

$$Y_{P/X} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{X_{m\acute{a}x}} \quad (22)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{S_0 - S_{P,m\acute{a}x}} \quad (23)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{m\acute{a}x}}{S_0 - S_{X,m\acute{a}x}} \quad (24)$$

Onde:

$Y_{P/X}$: fator de produção específica [U/mg];

$P_{m\acute{a}x}$: máxima atividade de pectinases [U/mL];

$X_{m\acute{a}x}$: máxima concentração celular [g/L];

$Y_{P/S}$: conversão de substrato em produto [U/mg];

S_0 : concentração inicial de substrato [g/L];

$S_{P,m\acute{a}x}$: concentração de substrato no instante em que há a máxima atividade de pectinases [g/L];

$Y_{X/S}$: conversão de substrato em células [g/g];

$S_{X,m\acute{a}x}$: concentração de substrato no instante em que há a máxima concentração celular [g/L].

A produtividade volumétrica (p_v) do processo pode ser calculada pela Equação 25.

$$p_v = \frac{P_{m\acute{a}x}}{t_{P,m\acute{a}x}} \quad (25)$$

Onde:

p_v : produtividade volumétrica [U/mL/h];

$t_{P,m\acute{a}x}$: tempo em que ocorre a máxima atividade de pectinases [h].

4.6.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio isento de células

A determinação da medida de transferência de oxigênio (K_La), em líquido isento de células, foi realizada, inicialmente, com a completa eliminação do oxigênio por meio do borbulhamento de um fluxo de nitrogênio puro, segundo o método esttico proposto por Moo-Young e Blanch (1989). Para isso, a calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido, capaz de

medir o percentual de oxigênio na saturação, foi feita com a frequência dos agitadores mantida constante e inicial introdução de nitrogênio puro no reator, até atingir um valor mínimo e constante, correspondendo à calibração de 0% de oxigênio. Após, ar comprimido seco foi injetado até o sistema registrar um valor máximo e constante, correspondendo à calibração de 100% de oxigênio.

A variação da concentração do oxigênio dissolvido com o tempo (dC/dt) para a determinação de $K_L a$ pode ser obtida segundo a Equação 26:

$$dC/dt = K_L a (C^* - C) \quad (26)$$

Onde:

C^* : concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio;

C : concentração de oxigênio dissolvido num dado instante de tempo.

Fazendo a integração da Equação 26 (Equação 27) entre as concentrações de oxigênio dissolvido C_1 e C_2 , com os respectivos tempos 0 e t , obtém-se a Equação 28.

$$\int_{C_1}^{C_2} \left(\frac{1}{C^* - C} \right) dC = \int_0^t K_L a dt \quad (27)$$

$$\ln (C^* - C_2) - \ln (C^* - C_1) = -K_L a \cdot (t - 0) \quad (28)$$

Sendo $C_1 = \alpha \cdot C^*$ e $C_2 = \beta \cdot C^*$, onde α e β são os percentuais da saturação para C_1 e C_2 , respectivamente, a Equação 28 também pode ser representada pela Equação 29.

$$\ln \left(\frac{C^* - \beta \cdot C^*}{C^* - \alpha \cdot C^*} \right) = -K_L a \cdot t \quad (29)$$

Isolando o termo C^* da Equação 29, tem-se a Equação 30.

$$\ln \left(\frac{1 - \beta}{1 - \alpha} \right) = -K_L a \cdot t \quad (30)$$

Portanto, para determinar o $K_L a$ em meio isento de células procede-se à Equação 31.

$$-K_L a = \frac{\ln \left(\frac{1 - \beta}{1 - \alpha} \right)}{t} \quad (31)$$

4.6.4 Velocidade de circulação do fluido

A velocidade de circulação do fluido em biorreator *airlift* foi calculada a partir do acionamento da aeração, que promovia a circulação de esferas de alginato com densidade semelhante ao fluido. Para cada vazão específica de gás, foram cronometrados os tempos, em triplicata, para que as esferas percorressem um dado comprimento no *downcomer* (x). A partir da Equação 32, foi obtida a velocidade média de circulação do fluido no *downcomer*, adaptada de Blenke (1979).

$$V_d = \frac{x}{t} \quad (32)$$

Onde:

V_d : velocidade de circulação do fluido no *downcomer* [cm/s];

x : distância entre 2 pontos, marcados no tubo externo [cm];

t : tempo necessário para que o traçador passasse por x [s].

4.7 DEGRADAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PECTINA

Os ensaios para degradação das soluções de pectina serviram para analisar se as variações de pH (2-12) causaram reações de saponificação do polímero, que, por sua vez, teriam reduzido o grau de metoxilação da pectina. Consequentemente, verificaria-se se teria ocorrido mudanças em sua viscosidade ou se teria somente relação com sua solubilidade. A metodologia, adaptada de Cerri (2009), segue abaixo:

- soluções de NaOH (5mol/L) e HCl (2mol/L) foram adicionadas às soluções de pectina (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%(m/v)) de modo a corrigir o pH a valores iguais a 2, 4, 6, 8, 10 e 12, cada uma;
- mediu-se a viscosidade das soluções, pós-correção do pH, com *spindle* adequado, a 60rpm e 28°C;
- reajustou-se o pH das soluções tratadas ao valor mínimo (pH 2);
- verificou-se a degraabilidade das soluções.

4.8 COMPARAÇÃO DE CORRELAÇÕES OU MODELOS BASEADOS EM DADOS EMPÍRICOS COM DADOS EXPERIMENTAIS PARA A ESTIMATIVA DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA

A fim de observar o ajuste dos dados experimentais acerca da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La), em biorreator de agitação mecânica, a modelos empíricos encontrados na literatura, adotou-se o seguinte procedimento, adaptado de Doran (2013):

- determinaram-se a viscosidade e massa específica dos fluidos. A viscosidade foi medida em viscosímetro, o mesmo utilizado para obtenção de dados de atividade de pectinases (item 4.5.4); a massa específica foi medida por pesagem de um volume conhecido de fluido;
- calculou-se o número de Reynolds (Re), levando em consideração o tipo de impelidor empregado, as frequências de trabalho e as propriedades físicas dos fluidos;
- determinou-se o tipo de regime de trabalho (laminar, transiente, turbulento), bem como calculou-se o número de potência (N_P);
- calculou-se a potência transmitida ao fluido, sem aeração (P_o), e fez-se a correção da mesma, ao considerar que foram utilizados três impelidores (multiplicou-se por 3);
- com as dimensões do tanque (D_T , V_L , H_L), calculou-se o fator de correção (f_c) e corrigiu-se o valor da potência transmitida ao fluido;
- calculou-se a potência transmitida ao fluido, com aeração (P_g), considerando as vazões de gás empregadas, bem como a correlação empírica mais apropriada para tais dados;
- calculou-se a área da seção transversal do tanque ($A_s = \Pi.D_T^2/4$) e a velocidade superficial do gás ($v_s = Q_v/A_s$);
- calculou-se o coeficiente de absorção (K_v) e considerou-se a correlação empírica mais apropriada para tais dados;
- calculou-se a constante de Henry (H), através da Lei de Henry, considerando a pressão parcial média do oxigênio na fase gasosa em Caxias do Sul (0,192atm) e a solubilidade do oxigênio em água de 7,17mg/L (0,224mmol/L), a 28°C. O valor obtido foi 0,857atm.L/mmolO₂;
- calculou-se a constante de Henry (H), através da Lei de Henry, para as soluções de pectina. O valor foi calculado através da comparação com uma solução de amido solúvel 20g/L, presente nos trabalhos de Schumpe e Quicker (1982). O valor de C^* estimado foi 0,25mmol/L e, com isso, o valor de H calculado e considerado para as soluções de pectina foi

0,84atm.L/mmolO₂, já que não existem valores tabelados na literatura para esse polissacarídeo;

- plotou-se um gráfico $K_{La_{\text{experimental}}}$ *versus* $K_{La_{\text{calculado}}}$ e comparou-se os dados.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados dos ensaios em que foi possível obter duplicatas ou triplicatas foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância (*One-way Anova*) e pós-teste de Tukey em nível de 5% ($P < 0,05$), com o auxílio do programa computacional GraphPrism.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho.

Os resultados foram separados em dois subitens (5.1 e 5.2), de modo a analisá-los separadamente, em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*, respectivamente.

Os testes com água destilada serviram como padrão de análise para os demais ensaios. As soluções de pectina, com diferentes percentuais mássicos, foram avaliadas inicialmente quanto ao transporte de oxigênio, para, em seguida, serem avaliadas quanto à produção de pectinases. As propriedades desses fluidos foram medidas analiticamente e os resultados encontram-se na Tabela 6. Os resultados mostram que tanto a viscosidade quanto o pH sofrem influência das mudanças de concentração mássica de pectina nas soluções, o que não acontece com a massa específica, a qual mantém-se praticamente constante.

Tabela 6 – Propriedade dos fluidos de processo, a 28°C

Fluido de processo	Viscosidade [cP]	Massa específica [g/mL]	pH
Água destilada	1,00	1,01	6,95
Solução 0,5%(m/v) pectina	2,12	0,97	3,50
Solução 1,0%(m/v) pectina	3,62	1,00	3,40
Solução 2,0%(m/v) pectina	9,02	0,99	3,30

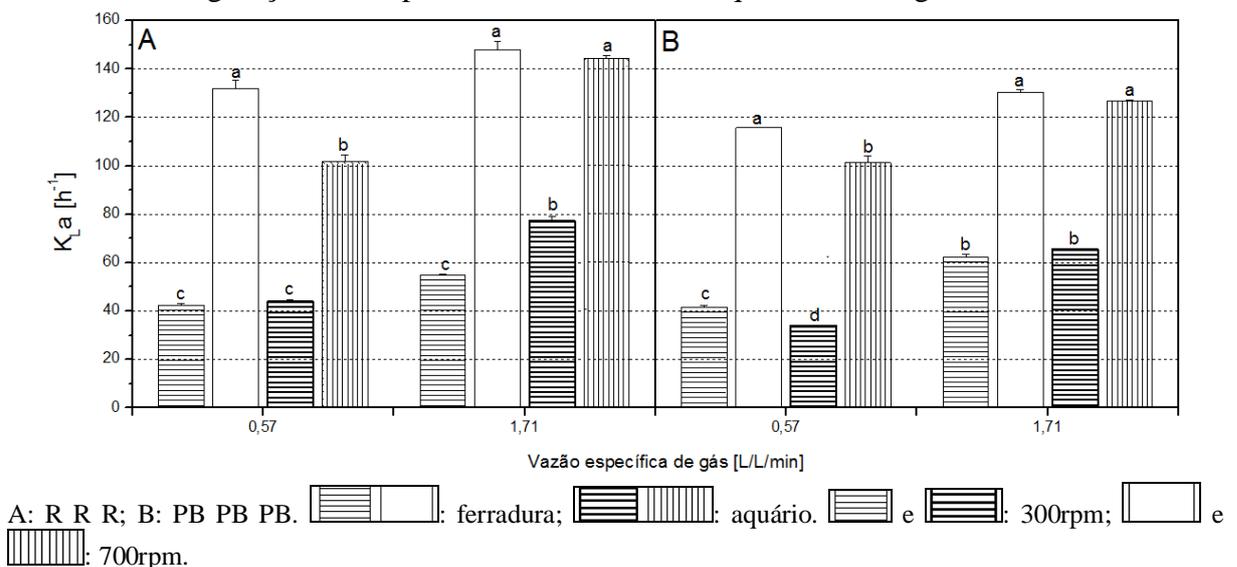
5.1 ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA

Neste item, são apresentados e discutidos, inicialmente, os resultados referentes à transferência de oxigênio em biorreator de bancada do tipo agitação mecânica. Em seguida, são avaliados os ajustes dos dados obtidos experimentalmente às correlações empíricas para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. Posteriormente, é discutida a questão da desesterificação da pectina frente ao pH e, finalmente, o processo de produção de pectinases de *Aspergillus oryzae* em processo submerso.

5.1.1 Ensaios de transferência de oxigênio gás-líquido, em água destilada e em solução de pectina

Os efeitos da vazão específica de gás, das configurações dos impelidores e dos aeradores e da frequência dos agitadores sobre a transferência de oxigênio em água e em solução de pectina 2%(m/v) são mostrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Os dados obtidos nos testes foram obtidos em duplicatas e analisados estatisticamente. A discussão mais detalhada desses dados é feita posteriormente, juntamente com a análise da transferência de oxigênio ao longo desse item.

Figura 15 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica em função da vazão específica de gás em água destilada, quando utilizadas diferentes configurações de impelidores, aeradores e frequências dos agitadores

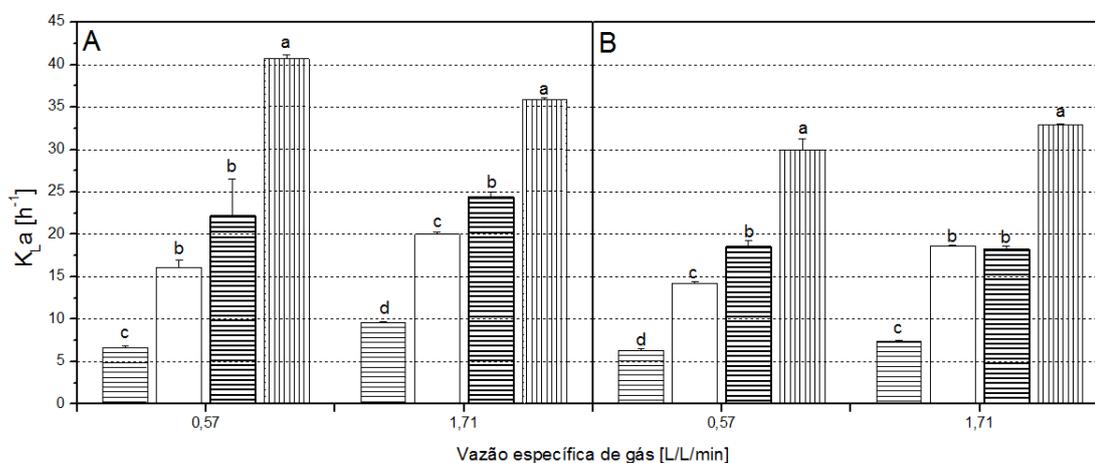


As letras estão em ordem decrescente de magnitude dos resultados: letras diferentes indicam que há diferenças significativas entre os resultados. Os resultados estatísticos devem ser analisados separadamente, em função da vazão específica de gás.

De modo semelhante, optou-se por verificar a influência dos aspersores dos tipos ferradura e aquário sobre o processo de transferência de oxigênio, por apresentarem os melhores resultados, como será discutido a seguir, descartando os resultados com o aspersor do tipo pedra sinterizada.

Para o planejamento fatorial, optou-se por analisar os dados sem o uso de um ponto central. Dessa forma, foram avaliadas as frequências dos impelidores e as vazões volumétricas de gás nos pontos extremos do processo (300 e 700rpm; 0,57 e 1,71L/L/min).

Figura 16 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator de agitação mecânica em função da vazão específica de gás em solução de pectina 2%(m/v), quando utilizadas diferentes configurações de impelidores, aeradores e frequências dos agitadores



A: R R R; B: PB PB PB. : ferradura; : aquário. e : 300rpm; e : 700rpm.

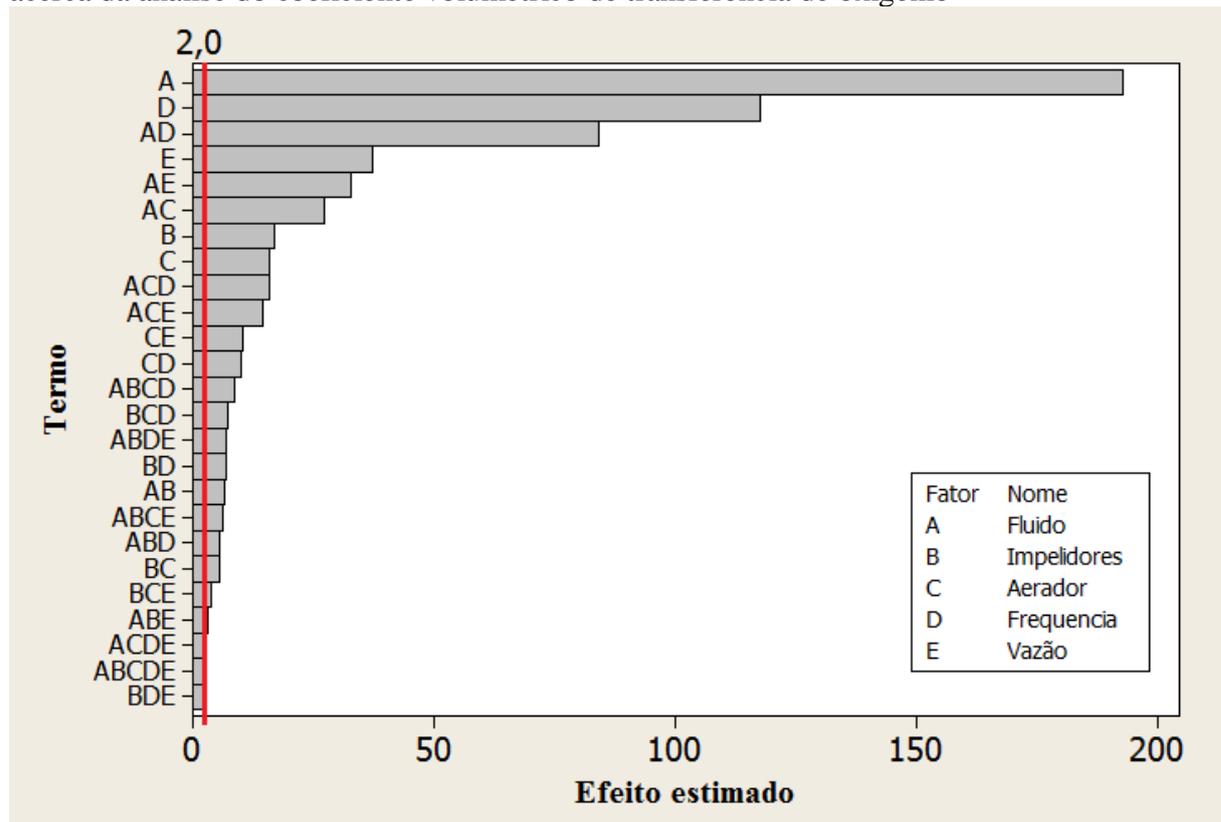
As letras estão em ordem decrescente de magnitude dos resultados: letras diferentes indicam que há diferenças significativas entre os resultados. Os resultados estatísticos devem ser analisados separadamente, em função da vazão específica de gás.

Considerando $\alpha = 0,05$, as interações que não são significativas ($P > 0,05$) e que podem ser excluídas são as interações B*E, D*E, A*B*C, A*D*E, C*D*E e B*C*D*E, onde as letras A, B, C, D e E representam, respectivamente, os parâmetros “fluido”, “impelidores”, “aerador”, “frequência” e “vazão”. Na Figura 17, é mostrado o diagrama de Pareto contendo os fatores e as interações significativas ($P < 0,05$). A linha vertical em vermelho representa o limite (2,0) em que as interações são significativas (à direita) e não significativas (à esquerda).

Pelo diagrama de Pareto, percebe-se que o fator que tem mais influência sobre o K_{La} é o fator A (fluido), mostrando o efeito da viscosidade sobre o transporte de oxigênio: os valores máximos atingidos de K_{La} foram de cerca de $140h^{-1}$ (Figura 15) e $40h^{-1}$ (Figura 16) para a água e para a solução de pectina 2%(m/v), respectivamente. Em seguida, a frequência dos impelidores (D), bem como sua interação com o tipo de fluido utilizado (AD) foram mais influentes. Puthli *et al.* (2005) sugerem que a frequência dos agitadores é o principal fator que afeta nas mudanças de valores de K_{La} , estando diretamente relacionado com a potência dissipada global de qualquer tipo de configuração de impelidores. Devido à rápida quebra das bolhas a altas frequências de agitadores, aumenta-se a área interfacial de transferência de massa gás-líquido e, conseqüentemente, valores superiores de K_{La} são obtidos. Os mesmos autores verificaram a influência da viscosidade do líquido sobre a transferência de massa,

comparando resultados em água e em soluções com diferentes concentrações de carboximetil celulose (CMC). Os resultados evidenciaram que os valores de $K_L a$ foram reduzidos com o aumento da viscosidade das soluções de CMC. Com isso, nota-se a influência da viscosidade da pectina, utilizada como indutor nesse trabalho, sobre a transferência de massa, mas principalmente sobre o coeficiente convectivo de transferência de massa (k_L). Supõe-se que, na fase líquida, tem-se uma película estagnada ao redor da bolha do gás, na qual se localizaria uma das resistências ao transporte do oxigênio, caracterizada pelo inverso do coeficiente de transporte na película líquida (SCHMIDELL, 2001). Com relação aos resultados desse trabalho, o maior valor de $K_L a$ calculado em água ($147,96 \pm 3,56 h^{-1}$ para a configuração A-ferradura-700rpm-1,71L/L/min) (Figura 15) é superior ao obtido em solução de pectina ($19,98 \pm 0,25 h^{-1}$ para a mesma configuração) (Figura 16) e a mesma tendência é apresentada para os demais valores comparativos.

Figura 17 – Diagrama de Pareto para os ensaios com água e solução de pectina 2%(m/v) acerca da análise do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio



Tanto em água quanto em solução do polissacarídeo, é observado que, com o aumento da vazão específica do gás, para qualquer combinação de impelidores e aeradores,

não se tem um aumento considerável na transferência de massa, ao contrário do que ocorre com o aumento da frequência dos agitadores (Figuras 15 e 16).

Posteriormente, também foi avaliada a influência da vazão (E) e sua interação com o líquido (AE) (Figura 17). A escolha pelo tipo de impelidor (B) e de aerador (D) utilizados no processo também tem substancial influência na determinação do K_{La} , porém são menos influentes que os demais fatores descritos acima (Figura 17). Esse fato também foi observado por Karimi *et al.* (2013), que relataram que o desenho do aerador e o mecanismo de formação de bolhas em tanques aerados e agitados não são tão importantes quanto aos efeitos provocados pelos agitadores. Em solução de pectina 2%(m/v), foi observada a grande influência do aspersor do tipo aquário, resultando em altos valores de K_{La} para quaisquer vazões e configurações de impelidores (Figura 16). Sardeing *et al.* (2004) realizaram um estudo avaliando o efeito da disposição do aspersor na dispersão do gás. Os autores inferiram que a transferência de massa é notavelmente distinta quando o tamanho do aerador e do impelidor são diferentes e que, quando essa relação é superior a 1, tem-se a formação do *impeller loading* (baixo bombeamento do gás dentro do reator, causado por altas vazões de gás e baixas frequências dos agitadores) e, com isso, são prejudicadas tanto a formação de grandes cavidades gasosas atrás das pás dos impelidores quanto as perdas de potência com a aeração. Esse fato está de acordo com os resultados obtidos quando utilizado, principalmente, o aspersor do tipo pedra sinterizada, o qual possui o menor diâmetro dentre os aspersores. Apesar de não apresentados os resultados, os menores valores de K_{La} em solução de pectina 2%(m/v) foram com a utilização desse aspersor, para qualquer configuração testada. Por outro lado, o aspersor do tipo pedra sinterizada mostrou-se mais eficaz no transporte de massa, atingindo valores de K_{La} cerca de $10h^{-1}$ e $20h^{-1}$ para 300 e 700rpm, respectivamente, para qualquer configuração de impelidores – dados aproximadamente duas vezes maiores que com o aspersor do tipo ferradura. Isso corrobora os dados de Rocha-Valadez *et al.* (2000), que calcularam valores de K_{La} superiores com aspersor do tipo pedra sinterizada do que com aspersor de cinco orifícios ($51,8h^{-1}$ e $12,6h^{-1}$, respectivamente) em meio de fermentação com propriedades reológicas diferentes deste estudo.

Tendo-se esses relatos em vista, então, foram excluídas as interações não significativas e recalcularam-se os coeficientes da regressão e a análise da variância. Com a remoção das interações não significativas, o valor de R-Sq (pred) aumentou de 99,79% para 99,83%, o qual é calculado a partir da estatística PRESS, que diminuiu o valor de 273,775 para 219,140. Isso sugere que a regressão calculada sem as interações não significativas tem maior capacidade preditiva.

Analisando os cálculos, bem como as Figuras 15, 16 e 17, não levando em consideração as interações entre os fatores, nota-se que para se obter os mais altos valores de K_{La} , é preciso utilizar água, na configuração de impelidores R R R, aerador do tipo aquário, a 700rpm e 1,71L/L/min.

Karimi *et al.* (2013) avaliaram o transporte de massa em biorreator de agitação mecânica provido de 1,77L de água deionizada, equipado com diferentes configurações de impelidores (Rushton ou *pitched blade* de 2 ou 4 pás), nas faixas de análise de 0,56 a 2,82L/L/min e 0 a 1000rpm. Os autores mostraram que o incremento do K_{La} para impelidores Rushton foi significativo entre 200 e 800rpm, o que está de acordo com os resultados deste ensaio. Também identificaram que, independentemente do tipo de impelidor *pitched blade*, esse aumento gradativo nos valores de K_{La} é menos acentuado e instável, além de o incremento do coeficiente acontecer a partir de 300rpm, fato também semelhante ocorrido nos resultados experimentais deste trabalho com esse tipo de impelidor. Relataram, ainda, que o aumento médio nos valores de K_{La} para impelidores Rushton é cerca de 60% superiores às demais configurações. Isso é explicado pelo fato de que impelidores Rushton serem mais eficientes na quebra das bolhas, pois apresentam uma área de seção transversal superior, aumentando a área superficial das bolhas melhorando a transferência de gás.

5.1.2 Avaliação do ajuste dos dados experimentais a correlações empíricas para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Como discutido previamente, algumas correlações empíricas são utilizadas para relacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) com as variáveis de operação (frequência dos impelidores, vazão de gás e potência do motor sob influência do gás), parâmetros geométricos do equipamento (volume do fluido e diâmetro do impelidor) e propriedades físicas do fluido (viscosidade e massa específica). Neste item, discute-se o ajuste dos dados experimentais e algumas correlações empíricas. Nesta análise, adotou-se o critério utilizado por Badino Jr. *et al.* (2001), que leva em conta que os dados experimentais ajustam-se aos dados calculados se os mesmos estiverem a menos de 25% de diferença entre si. Vale ressaltar que os resultados a seguir foram obtidos com base nos ensaios feitos em água e em solução de pectina 2%(m/v), em biorreator de agitação mecânica, utilizando o aspensor do tipo aquário (Figura 13).

5.1.2.1 Correlações para a água

Para a determinação das correlações que mais se ajustassem aos dados experimentais dos ensaios em água, em biorreator de agitação mecânica, optou-se por avaliar quatro correlações, como seguem:

Determinação da potência aerada (P_g):

- correlação 1: proposta por Miller (1974) – Equações 5 e 6;
- correlação 2: proposta por Schmidell (2001) – Equação 7;

Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}):

- correlação 3: proposta por Richards (1961) – Equação 13;
- correlação 4: proposta por Wang *et al.* (1979) – Equação 14.

Ensaio preliminares foram realizados utilizando os impelidores Rushton e *pitched blade* em biorreator de agitação mecânica. O volume do líquido foi de 3,5L, as vazões volumétricas de gás foram 0,57 e 1,71L/L/min e as frequências dos impelidores foram de 300, 500 e 700rpm.

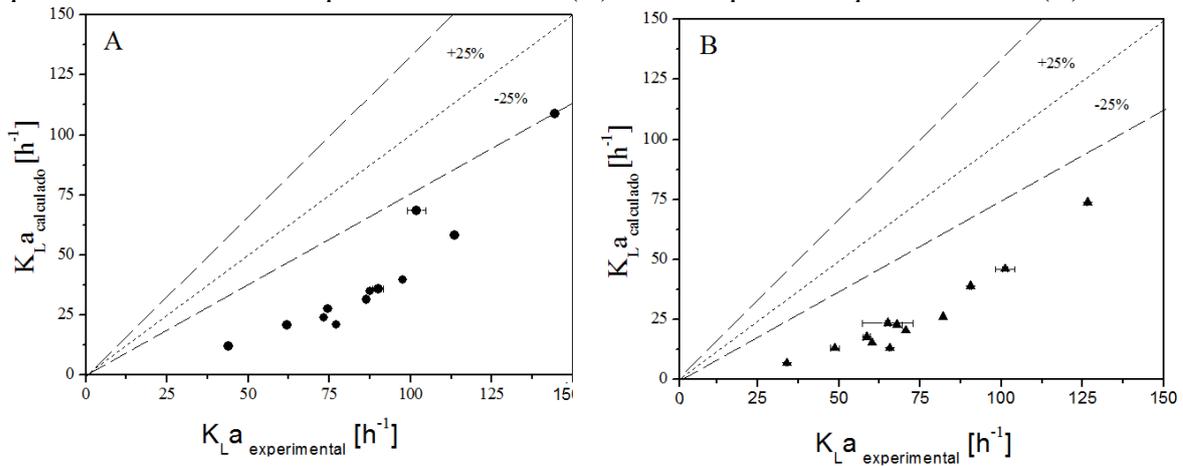
Ao avaliar os valores de K_{La} calculado e K_{La} experimental, independentemente de utilizar a correlação 1 ou 2, estas geraram resultados semelhantes, haja vista que os valores da constante c são próximas (para a correlação 1, o valor de c é 0,706; para 2, o valor é 0,545). Além disso, para altas frequências dos impelidores e de vazões de gás (700rpm e 1,71L/L/min), os valores calculados distanciaram-se consideravelmente dos valores experimentais.

Nos ensaios subsequentes foi utilizada a equação proposta por Miller (1974), por ser a mais tradicional. Somado a isso optou-se por menores frequências dos agitadores (350, 400 e 450rpm) em menores vazões volumétricas de gás (0,86 e 1,14L/L/min) (Figura 13), de modo a ter uma maior quantidade de pontos experimentais que, posteriormente, serviram para ajustar as curvas em regressões lineares.

Independentemente do tipo de impelidor e das condições de processo empregados, os cálculos mostraram que o regime de trabalho foi turbulento, ou seja, os valores do número de potência foram constantes com as variações do número de Reynolds.

Os resultados para as correlações empíricas de Miller (1974), juntamente com as de Richards (1961), para a água, utilizando três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B), são mostrados na Figura 18.

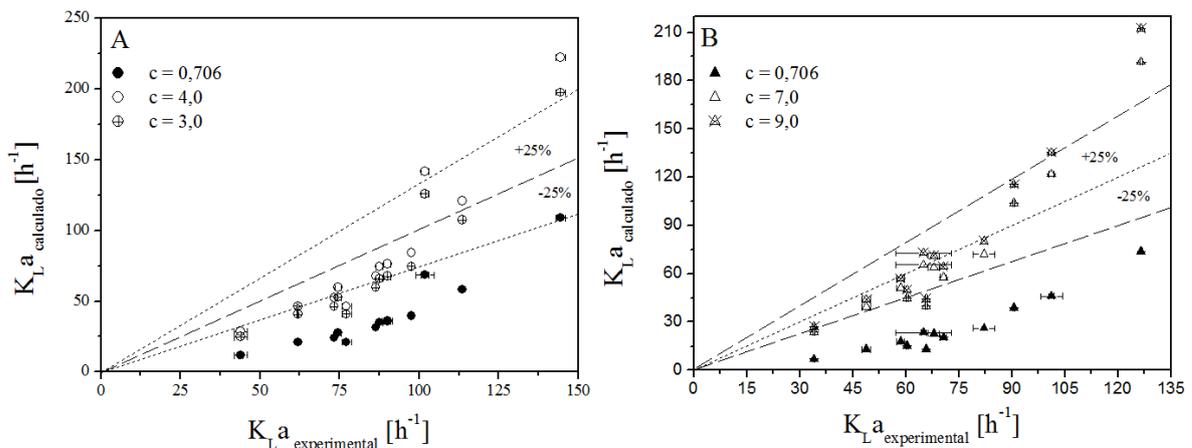
Figura 18 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974) e Richards (1961), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)



Os dados da Figura 18 inferem que os dados experimentais não se ajustaram às correlações avaliadas, indicando que nenhum dos modelos pode ser utilizado para estimar o $K_L a$ em água no sistema em teste. Em qualquer um dos casos, os valores do $K_L a_{\text{calculado}}$ foram inferiores aos valores do $K_L a_{\text{experimental}}$, e essa diferença foi superior a 25%, indicando a necessidade de ajuste das correlações propostas.

Sendo assim, optou-se por variar o valor da constante c do modelo de Miller (1974). Os resultados estão mostrados na Figura 19.

Figura 19 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974), adaptada, e Richards (1961), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)



Na condição A, para que os valores de $K_{La_{\text{experimental}}}$ ficassem ajustados aos do $K_{La_{\text{calculado}}}$, foi necessário que a constante c fosse aumentada de seu valor original (0,706) para valores entre 3,0 para 4,0. Já na condição B, esse aumento precisou ser ainda superior: entre 7,0 e 9,0. Segundo os modelos relatados na revisão bibliográfica, as variações da constante c , em nenhum caso, chegam a ser maior que a unidade: 0,545 e 0,405 (SCHMIDELL, 2001), nas equações 7 e 8, respectivamente e 0,832 (BADINO JR. *et al.*, 2001), na equação 9. Sendo assim, detectou-se que o problema do ajuste não seria em relação ao modelo proposto por Miller (1974), e sim no proposto por Richards (1961). Dessa maneira, recalculou-se os valores do $K_{La_{\text{calculado}}}$, porém utilizando-se o modelo empírico proposto por Wang *et al.* (1979). Os resultados são mostrados na Figura 20.

Comparando-se os resultados das Figuras 18 e 20, percebe-se que os dados estão mais ajustados ao modelo proposto por Wang *et al.* (1979) que por Richards (1961). Entretanto, algumas modificações foram propostas de modo a melhor ajustar os dados. Sendo assim, variou-se o valor do expoente do termo (P_g/V) , denominado como constante k' , da correlação de Wang *et al.* (1979). Os resultados estão apresentados na Figura 21.

Em ambas as condições da Figura 21, os valores de $K_{La_{\text{calculado}}}$ ficaram próximos aos valores do $K_{La_{\text{experimental}}}$ quando o valor da constante k' foi substituída pelos valores de 0,30 e 0,50. Esses valores não se distanciaram expressivamente do valor original de 0,77, quando comparados, em termos de ordem de grandeza, com os resultados avaliados na Figura 19.

Figura 20 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974) e Wang *et al.* (1979), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)

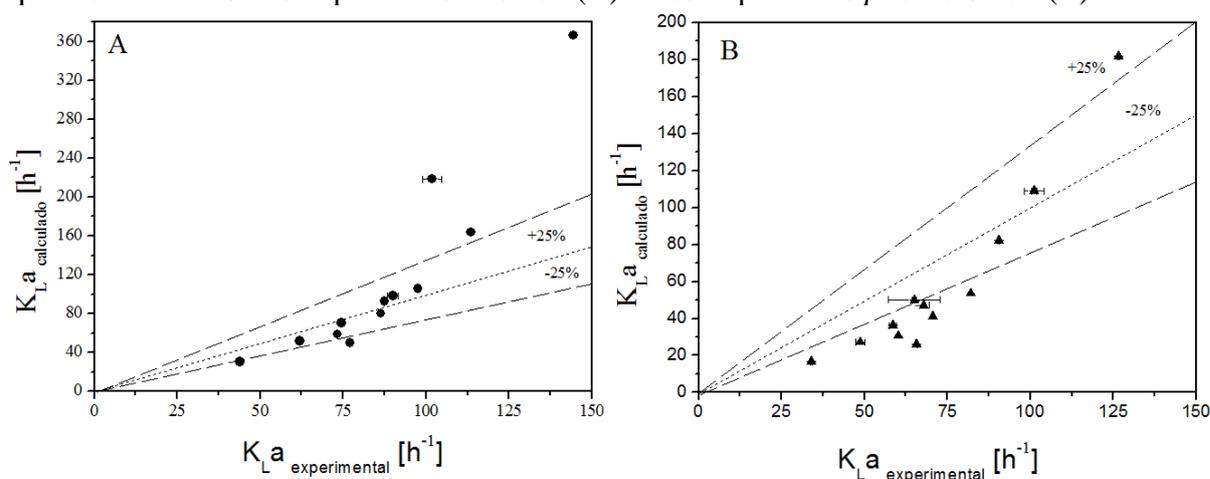
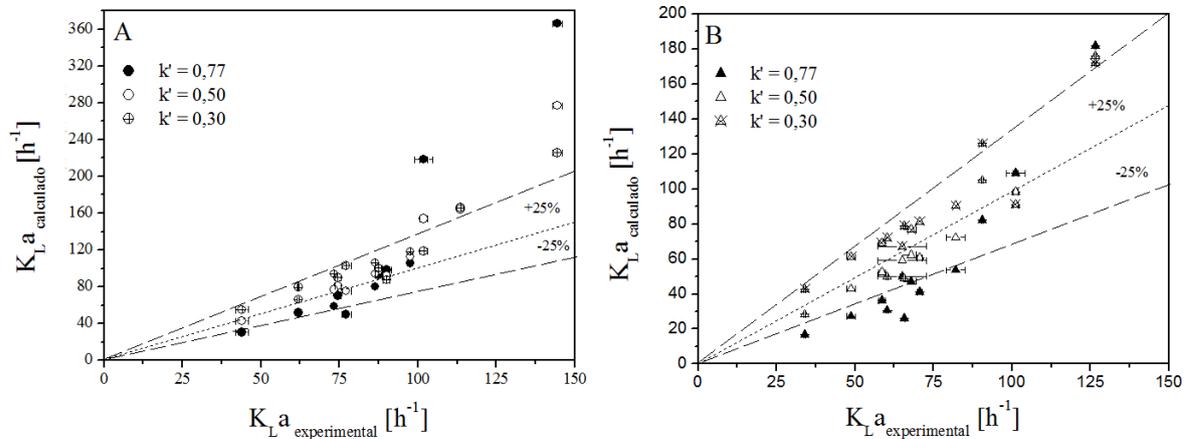


Figura 21 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água, usando as correlações propostas por Miller (1974), e Wang *et al.* (1979) adaptada, quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)



Sob outra análise, alguns valores de $K_{L,a_{\text{experimental}}}$ foram inferiores aos valores de $K_{L,a_{\text{calculado}}}$ para altas vazões de gás e frequência dos impelidores do tipo Rushton (Figura 21A). Isso, possivelmente, ocorreu devido ao método de análise de dados: Wang *et al.* (1979) utilizaram o método de oxidação de sulfito e obtiveram valores de $K_{L,a}$ cuja ordem de grandeza, por vezes, distancia-se daqueles obtidos neste trabalho, os quais foram calculados pelo método estático proposto por Moo-Young e Blanch (1989). Para tentar ajustar esses valores e encontrar valores de $K_{L,a_{\text{experimental}}}$ próximos aos de $K_{L,a_{\text{calculado}}}$ do modelo empírico, ensaios preliminares utilizando até 5 impelidores foram realizados a altas vazões volumétricas de gás (1,71L/L/min) e frequências dos agitadores (700rpm). Porém, o incremento no $K_{L,a}$ ao aumentar o número de impelidores foi irrisório, indicando que, possivelmente, o tempo de resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido não é suficientemente curto para que se avalie o $K_{L,a}$ pelo método usado no presente trabalho quando condições de transferência de massa mais intensas são empregadas. Badino Jr. *et al.* (2001) explicam que vários métodos físicos para estimar o $K_{L,a}$ são baseados nas mudanças de concentração de oxigênio em relação ao tempo e, dessa forma, esses métodos podem ser inadequados, já que o tempo de resposta do eletrodo não é instantâneo. Somado a isso, outro agravante para a determinação do $K_{L,a}$ é quando se deseja determiná-lo em processos envolvendo microrganismos. Então, de modo a levar em conta esse tempo de resposta em tais processos, os mesmos autores referenciam outros métodos alternativos que levam em conta o tempo de atraso de resposta do eletrodo do gás, os quais são muito trabalhosos para meios inoculados. Dessa forma, torna-se interessante

avaliar esse parâmetro através de correlações empíricas, principalmente para condições de processos extremas.

Os dados da Tabela 7, bem como os resultados expressos na Figura 21, mostram que as correlações propostas por Miller (1974) para determinar P_g , e por Wang *et al.* (1979), readaptada, para determinar o K_{La} , podem ser usadas para determinar o K_{La} em água, em amplas faixas de vazões volumétricas de gás (entre 0,57 e 1,71L/L/min) e frequências dos impelidores (entre 300 e 700rpm).

Analisando os valores do coeficiente da regressão linear, é possível inferir que o melhor ajuste dos dados experimentais é quando utilizado o valor de k' de 0,50, por apresentar valores superiores de R^2 tanto quando utilizados impelidores do tipo Rushton quando avaliados impelidores do tipo *pitched blade*. Esses valores são comparáveis com dados explicitados por Badino Jr. *et al.* (2001), referentes aos valores de R^2 entre 0,90 e 0,92 utilizando modelos da literatura. Estes dados foram utilizados para avaliar a transferência de oxigênio em fluidos não-Newtonianos.

Outra vantagem em se utilizar o modelo de Wang *et al.* (1979), como explica Badino Jr. *et al.* (2001), é que correlações mais complexas melhoram a qualidade do ajuste linear (valores de R^2 mais altos). Isso está de acordo com os resultados obtidos, já que a presença do termo com o número de impelidores (N_i) é adicionado ao modelo original proposto por Cooper *et al.* (1944).

Tabela 7 – Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em água

Correlação empírica	Referência base	Coeficiente da regressão linear (R^2)		Pontos experimentais
		Rushton	<i>Pitched blade</i>	
		(A)	(B)	
$K_{La} = (2,0 + 2,8N_i) \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,77} (v_s)^{0,67}$		0,823	0,883	
$K_{La} = (2,0 + 2,8N_i) \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,50} (v_s)^{0,67}$	Wang <i>et al.</i> (1979)	0,902	0,911	12
$K_{La} = (2,0 + 2,8N_i) \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,30} (v_s)^{0,67}$		0,895	0,856	

5.1.2.2 Correlações para soluções de pectina

Para a determinação das correlações que mais se ajustassem aos dados experimentais dos ensaios em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), em biorreator de agitação mecânica, a potência aerada (P_g) foi determinada pela correlação de Miller (1974) (Equação 6), pelos mesmos motivos de escolha nos ensaios em água. Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), foi analisada a correlação proposta por Wang *et al.* (1979) (Equação 14), por ser mais complexo que a equação tradicional de Richards (1961) e ser a que melhor se ajustou aos dados em água, e a correlação de Badino Jr. *et al.* (2001) (Equação 17), por levar em consideração o termo referente à viscosidade do fluido, haja vista que esse parâmetro tem mudanças em seu valor com o aumento da concentração de pectina (Tabela 6).

As vazões de gás, as frequências dos impelidores e o volume de fluido foram os mesmos dos ensaios em água. Não foi avaliada a solução de pectina 2%(m/v), pois devido à alta viscosidade do fluido, as medidas para determinação do K_{La} foram inconclusivas para essa análise.

Para os ensaios com impelidores Rushton, independentemente da concentração da pectina, calculou-se o regime de trabalho como sendo intermediário entre transiente e turbulento, gerando, assim, valores do número de potência variáveis com as mudanças do número de Reynolds. Já quando empregados impelidores *pitched blade*, com 0,5%(m/v) de pectina, o regime foi turbulento, semelhante à água. Com 1,0%(m/v) de pectina, o regime foi transiente (Equação 2 e Figura 7).

Por não haver valores tabelados nem mesmo equações encontradas na literatura para a determinação da solubilidade do oxigênio em soluções de pectina, a constante de Henry (H) foi calculada utilizando-se a solubilidade do oxigênio em solução de amido conforme já discutido.

Os resultados para as correlações empíricas de Miller (1974), juntamente com as de Wang *et al.* (1979), para as soluções de pectina, utilizando três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B) são mostrados na Figura 22.

Para ambas as condições, os valores de $K_{La_{calculado}}$ ficaram próximos aos valores do $K_{La_{experimental}}$, sem nenhuma readaptação dos modelos empíricos. Assim, a inclusão do termo referente ao número de impelidores (N_i) ao modelo original, proposto por Cooper *et al.* (1944), discutido anteriormente, torna o modelo empírico mais complexo, pois não considera somente o efeito da potência consumida sob aeração por unidade de volume (P_g/V) e da velocidade superficial do gás (v_s) sobre o K_{La} , corroborando, mais uma vez, os relatos de Badino Jr. *et al.* (2001). Entretanto, para altas vazões de gás e frequência dos impelidores,

alguns valores de $K_{La_{\text{experimental}}}$ foram inferiores aos de $K_{La_{\text{calculado}}}$ e não ajustados na faixa de $\pm 25\%$ de erro, independentemente do tipo de impelidor empregado, confirmando os relatos discutidos anteriormente acerca dos ensaios em água. Outra explicação poderia ser referente ao regime de trabalho que, por sofrer substancial influência da viscosidade do fluido, modifica o número de Reynolds e gera, conseqüentemente, mudanças na potência requerida pelo sistema, bem como no número de potência.

Na tentativa de diminuir esse efeito negativo, posteriormente recalculou-se os valores do $K_{La_{\text{calculado}}}$ utilizando-se o modelo empírico proposto nos trabalhos de Badino Jr. *et al.* (2001) (Equação 17). Por não estarem expressas as unidades utilizadas pelos autores, os valores de P_g , V , v_s e μ_{ap} foram calculados em HP, L, cm/min e kg/m/s, respectivamente. Os resultados são mostrados na Figura 23.

A análise dos dados da Figura 23 mostra que, com a utilização do modelo descrito por Badino Jr. *et al.* (2001), não se tem um ajuste eficaz dos dados empíricos com os experimentais. Em ambos os casos, os valores do $K_{La_{\text{calculado}}}$ foram, na grande maioria, superiores aos valores do $K_{La_{\text{experimental}}}$, e essa diferença foi superior a 25%, indicando a necessidade de reajuste do modelo proposto. Dessa maneira, optou-se por variar o valor do coeficiente de valor “19,89” do modelo proposto (Equação 17), denominado como constante k'' , de modo a evitar a manipulação dos expoentes que, segundo já discutido, não sofrem grandes variações em seus valores originais quando analisados por diferentes autores. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

Figura 22 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Wang *et al.* (1979), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)

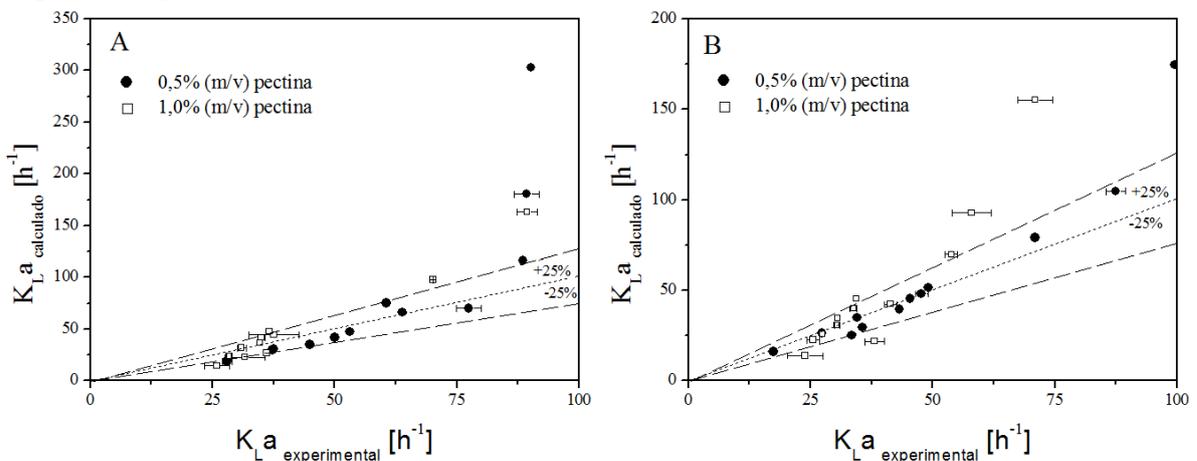
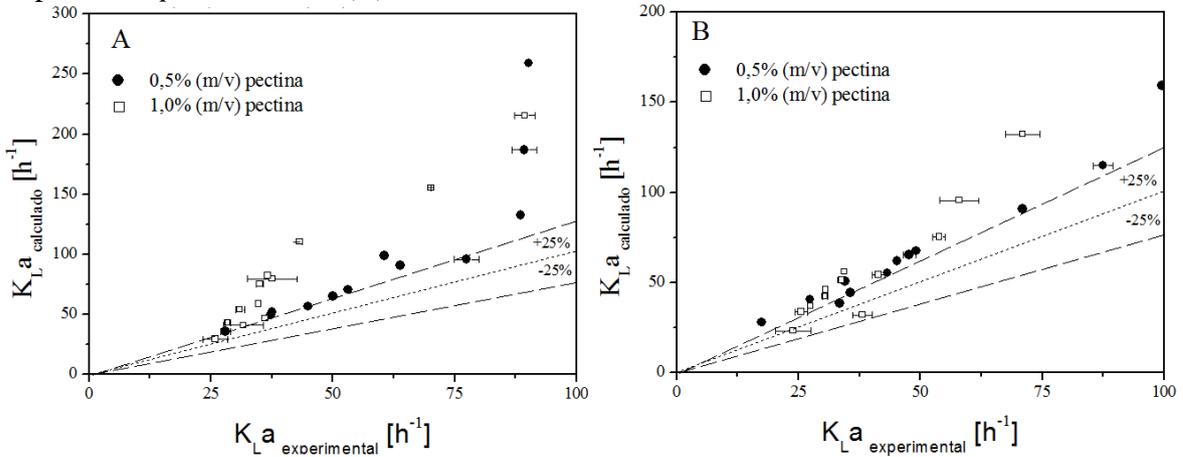


Figura 23 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Badino Jr. *et al.* (2001), quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)



Para ambas as condições, os valores de $K_{L,a} \text{ calculado}$ aproximaram-se dos valores do $K_{L,a} \text{ experimental}$ quando o valor da constante k'' foi substituído por 15,00. Sendo assim, os dados da Tabela 8, bem como os resultados expressos na Figura 24, mostram que as correlações propostas por Miller (1974) para determinar P_g , e por estudos de Badino Jr. *et al.* (2001) para determinar o $K_L a$, sendo readaptada, podem ser usadas para determinar o $K_L a$ em soluções de pectina com percentual mássica de 0,5% e 1,0%, em amplas faixas de vazões de gás (entre 0,57 e 1,71L/L/min) e frequências dos impelidores (entre 300 e 700rpm).

Figura 24 – Dados experimentais e calculados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina (0,5 e 1,0%(m/v)), usando as correlações propostas por Miller (1974) e Badino Jr. *et al.* (2001) adaptada, quando utilizados três impelidores Rushton (A) e três impelidores *pitched blade* (B)

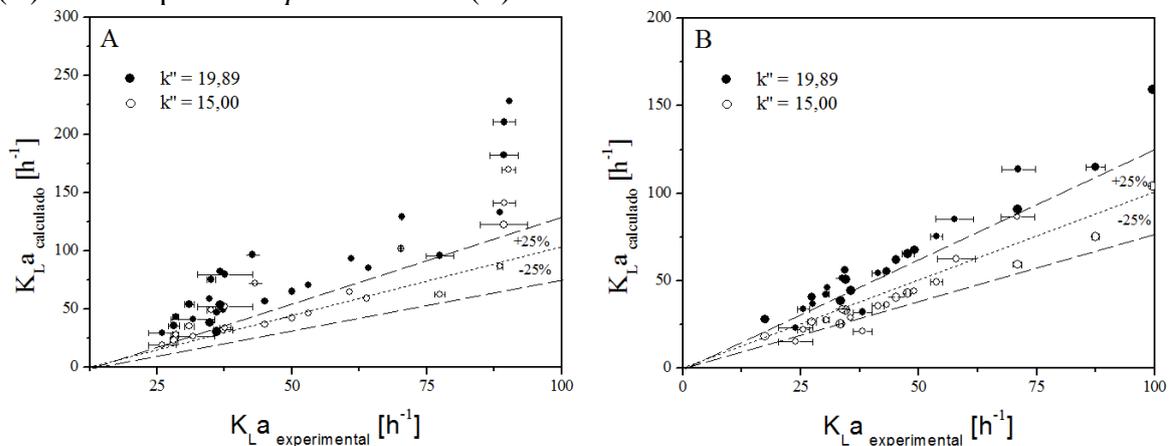


Tabela 8 – Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina 0,5 e 1,0% (m/v)

Correlação empírica	Referência base	Coeficiente da regressão linear (R^2)		Pontos experimentais
		Rushton	<i>Pitched blade</i>	
		(A)	(B)	
$K_L a = (2,0 + 2,8N_i) \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,50} (v_s)^{0,67}$	Wang <i>et al.</i> (1979)	0,698	0,845	
$K_L a = 19,89 \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,53} (v_s)^{0,43} (\mu_{ap})^{-0,12}$	Badino Jr. <i>et al.</i> (2001)	0,767	0,914	24
$K_L a = 15,00 \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0,53} (v_s)^{0,43} (\mu_{ap})^{-0,12}$		0,767	0,914	

Analisando os valores do coeficiente da regressão linear (Tabela 8), é possível inferir que o melhor ajuste dos dados experimentais é quando utilizados os valores de k'' tanto de 19,89 quanto 15,00, por apresentar os valores de R^2 mais elevados, tanto para impelidores do tipo Rushton quanto do tipo *pitched blade*. Porém, as funções lineares que representam esses dados (K_{La} calculado em função do K_{La} experimental) e que possuem o coeficiente angular mais próximo da unidade são aquelas quando o valor de k'' da correlação descrita por Badino Jr. *et al.* (2001) é igual a 15,00 (Tabela 9), sendo, portanto, mais correto utilizá-la para representar os dados.

Tabela 9 – Funções lineares que representam a correlação empírica descrita por Badino Jr. *et al.* (2001) e sua adaptação para descrever os dados de determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em soluções de pectina 0,5 e 1,0% (m/v)

Valor de k'' da correlação de descrita por Badino Jr. <i>et al.</i> (2001)	$y = f(x)$	
	$K_{La} \text{ calculado} = f(K_{La} \text{ experimental})$	
	Rushton	<i>Pitched blade</i>
19,89	$y = 2,355x - 28,745$	$y = 1,539x - 18,786$
15,00	$y = 1,431x - 2,145$	$y = 1,023x - 7,345$

5.1.3 Desesterificação das soluções de pectina

Devido à presença da pectina, a qual tem substancial influência prejudicial da viscosidade sobre o fluido, foram realizados ensaios para verificar a possibilidade em se

desesterificar esse polissacarídeo. Além disso, como já foi discutido, essa análise serviu de alicerce para melhor interpretar o efeito da adição desse polímero sobre o k_L , supondo-se que, na fase líquida, tem-se uma película estagnada que influencia no transporte de oxigênio.

A verificação da desesterificação das soluções de pectina, ou seja, se a adição de ácido (HCl) ou base (NaOH) causaram mudanças reológicas nas soluções poliméricas, é mostrada pelas curvas de pH em função da concentração de pectina (Figura 25). O aspecto visual das soluções 1,5%(m/v) de pectina tratadas com ácido e base, escolhidas aleatoriamente, é mostrado na Figura 26. Vale ressaltar que os valores apresentados na Figura 25 diferem-se daqueles mostrados na Tabela 6, pois foi necessário mudar o *spindle* do viscosímetro para as medidas de viscosidade (aparente), de modo que todos os dados fossem comparados igualmente.

Os resultados da Figura 25 evidenciam que, independentemente da concentração de pectina, a viscosidade da solução é inversamente proporcional ao pH. Por outro lado, o aumento na concentração de pectina leva ao aumento da viscosidade, independentemente do pH. Com isso, foi possível inferir que a viscosidade muda em função da concentração de pectina e do pH, o que também pode ser observado pela coloração diferenciada das soluções sob diferentes valores de pH (Figura 26). Porém, para saber se a mudança de pH de valores mais baixos para valores mais altos – hidrólise alcalina – resultou realmente na desesterificação polimérica ou se houve simplesmente o aumento da solubilidade da pectina, testou-se, posteriormente, o reajuste do pH das soluções de pectina 1,5%(m/v) tratadas, a um valor fixo de pH (pH 2), escolhido aleatoriamente, em triplicatas. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Figura 25 – Perfis de viscosidade aparente em função do pH de diferentes concentrações de pectina

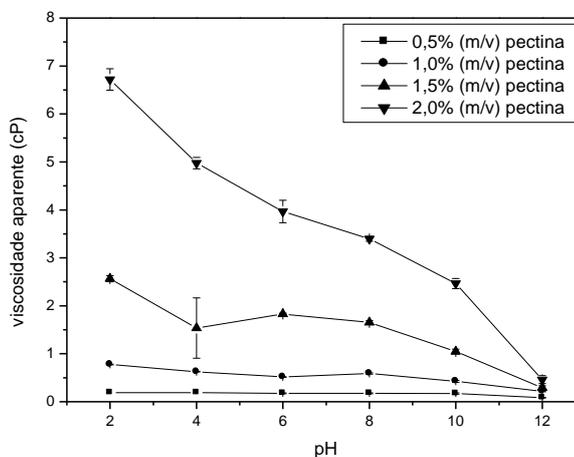


Figura 26 – Aspecto das soluções de pectina 1,5% (m/v) em diferentes valores de pH

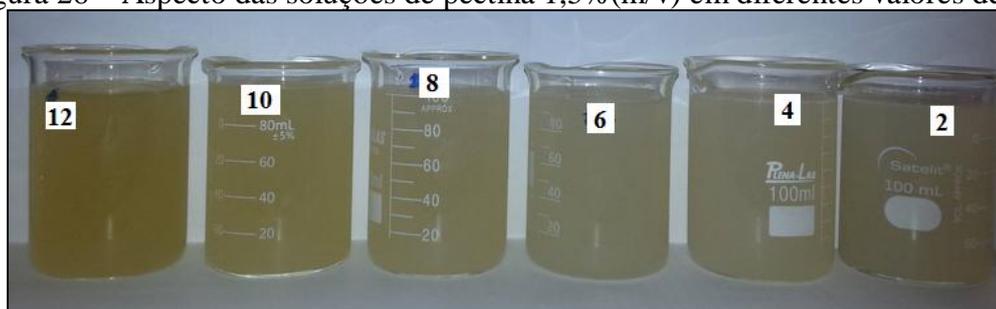


Tabela 10 – Reajuste do pH das soluções de pectina 1,5% (m/v) desesterificadas para pH 2

pH	μ [cP]	$\mu_{\text{após reajuste a pH 2}}$ [cP]
2	2,56(\pm 0,06) ^a	2,56(\pm 0,06) ^a
4	1,53(\pm 0,63) ^b	2,26(\pm 0,08) ^b
6	1,83(\pm 0,01) ^c	1,99(\pm 0,10) ^c
8	1,65(\pm 0,03) ^d	1,64(\pm 0,11) ^d
10	1,04(\pm 0,05) ^e	1,07(\pm 0,07) ^e
12	0,29(\pm 0,04) ^f	0,31(\pm 0,01) ^f

As letras estão em ordem decrescente de magnitude dos resultados: letras diferentes indicam que há diferenças significativas entre os resultados.

Por análise estatística dos dados da Tabela 10 conclui-se que com o tratamento das soluções de pectina 1,5% (m/v) não foram calculadas diferenças significativas entre os valores de viscosidade (aparente), para qualquer pH analisado individualmente. Além disso, foi observado que, após o reajuste do pH, a solução adquiria coloração semelhante àquela cujo pH era igual a 2 (Figura 26). Com isso, prova-se estatisticamente que o que ocorreu com as amostras realmente foi a hidrólise alcalina, e não a solubilização do polímero. Testes semelhantes foram feitos com as demais concentrações de soluções e os resultados foram praticamente os mesmos.

5.1.4 Avaliação do processo de produção de pectinases em reator de agitação mecânica

Tendo-se em vista a complexidade do processo submerso para produção de pectinases por *A. oryzae*, optou-se por realizar-se o cultivo em três diferentes condições, conforme é detalhado a seguir. A primeira condição (I) seguiu o padrão já definido na literatura (MENEGHEL, 2013); configuração dos impelidores: R R R e aerador do tipo

ferradura. A segunda condição (II) foi definida com base nos resultados apresentados anteriormente no item 5.1, principalmente levando em conta as conclusões parciais apresentadas no item 5.1.1.1:

- a configuração dos impelidores não é substancialmente influente quando usados fluidos de viscosidades distintas. Com isso, optou-se por utilizar a mesma configuração de impelidores da condição A (R R R);
- o aspersor do tipo aquário apresentou melhores resultados em termos de K_{La} , principalmente em solução de pectina 2%(m/v).

Consideraram-se esses fatores porque fazem referência às condições de viscosidade que mais se assemelham às condições reológicas do cultivo durante o processo de obtenção de pectinases.

A terceira condição (III) foi baseada nos testes de desesterificação das soluções de pectina, descritos no item 5.3. Sabendo-se que a hidrólise alcalina da pectina proporciona a diminuição da viscosidade do fluido, acreditava-se que isso auxiliaria favoravelmente o processo de transferência de oxigênio e, possivelmente, resultaria em maiores títulos em termos de biomassa microbiana e produção de pectinases. A escolha pela configuração R R R e aspersor do tipo aquário seguiram os mesmos motivos retratados acima.

Os ensaios foram realizados com adição do indutor para produção enzimática no início do processo, a fim de evitar possíveis problemas de assepsia. A frequência dos agitadores e a vazão volumétrica do gás iniciais foram 300rpm e 0,57L/L/min, respectivamente. O pH inicial foi ajustado em 4,0, com queda natural até 2,7. A escolha por esses valores foi devido aos resultados avaliados por Malvessi e Silveira (2004) e Fontana *et al.* (2009), acerca da obtenção de pectinases. Os autores relataram que esses resultados evidenciam valores de biomassa microbiana a títulos mais elevados (pH 4,0) e pH 2,7 favorece o aumento da atividade enzimática.

Os perfis de crescimento celular, consumo de substrato, oxigênio dissolvido, pH, atividade enzimática e vazão específica de gás são mostrados na Figura 27. Os resultados gerais desses cultivos são apresentados na Tabela 11.

Para as condições II e III, em que foram utilizados o aspersor de gás do tipo aquário, os valores calculados para os K_{La} 's foram aproximadamente $17h^{-1}$ e $30h^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram superiores à condição I ($K_{La} = 9h^{-1}$), sugerindo um processo de transporte de gás mais eficiente, inicialmente, principalmente na condição III, em que o K_{La} é cerca de três vezes maior que a condição padrão. Isso sugere que a desesterificação da pectina, além de diminuir a viscosidade do meio de fermentação, facilita o transporte de oxigênio. Esses dados

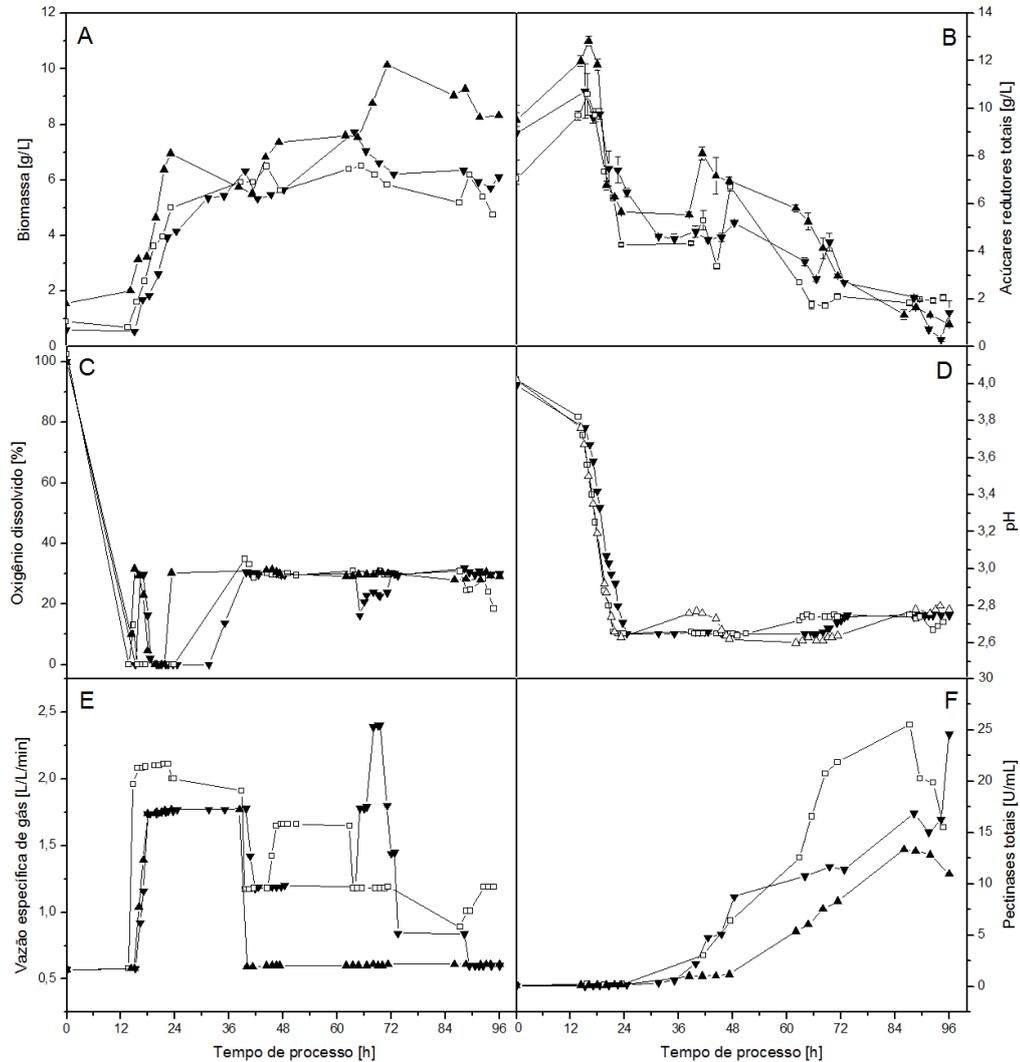
são condizentes com aqueles apresentados na Figura 16, considerando que a solução de pectina 2%(m/v) é a que mais se assemelha ao meio de cultivo, em termos reológicos (na condição I-300rpm-0,57L/L/min-ferradura, o K_{La} calculado foi $6,84h^{-1}$; na mesma condição, porém com o aerador aquário, o K_{La} calculado foi $20,52h^{-1}$). Isso corrobora, mais uma vez, os relatos de Rocha-Valadez *et al.* (2000), discutidos previamente.

Na Figura 27, é observada, em ambas as condições, uma fase de adaptação microbiana (fase *lag*) de aproximadamente 12h e, após esse período, evidenciou-se o aumento da biomassa fúngica. Em função disso, queda acentuada do percentual de oxigênio dissolvido foi identificado, permanecendo zerado até 32h (I), 24h (II) e 22h (III) de cultivo, com a obtenção da máxima concentração celular (7,73g/L em I, 6,49g/L em II e 10,14g/L em III) (Tabela 11). Michelin *et al.* (2013) destacam que o consumo de oxigênio tende a se aproximar da velocidade de transferência do gás na fase de crescimento exponencial e, dessa maneira, o percentual de oxigênio dissolvido no meio tende a diminuir, fato que também pode ser observado na Figura 27, independentemente da condição testada. Meneghel (2013) ressalta que a redução do oxigênio dissolvido a valores limitantes para o microrganismo caracteriza o aumento da concentração de células microbianas, juntamente com o aumento visível da viscosidade do meio de fermentação. Com a intensa desaceleração do crescimento fúngico, atinge-se a fase estacionária, caracterizada pelo aumento da concentração do oxigênio dissolvido e redução da demanda do gás, também observados na Figura 27.

O consumo de açúcares redutores totais nos três ensaios acompanhou inversamente o crescimento celular, com intensa velocidade de consumo de carboidratos entre 15 e 30h de processo, e redução após esse período, possivelmente resultante da baixa concentração de substrato disponível para o microrganismo. Verificou-se, ainda, que o consumo de substrato (S_{cons}) foi superior na condição III. No entanto, os valores dos fatores de produção específica, conversão de substrato em células e de substrato em pectinases foram inferiores na mesma condição. Isso se deve, provavelmente, a maior concentração de substrato disponível para o microrganismo, a qual não é consumida na condição III, principalmente entre 40 e 65h de cultivo (Figura 27B), favorecendo o crescimento celular e desfavorecendo a produção enzimática nessa condição, como também relatado por Poletto (2015), na produção de pectinases por *A. niger* em processo em estado sólido.

O pH inicial do meio sofreu uma queda brusca até 2,70 em 20-24h nos três ensaios. Após esse período o parâmetro foi controlado em $2,70(\pm 0,05)$ até o final do processo. Segundo Moore-Landecker (1996), esse comportamento de queda característico está relacionado ao acúmulo de ácidos orgânicos que contribuem para a acidificação do meio.

Figura 27 – Variação da biomassa celular (A), açúcares redutores totais (B), oxigênio dissolvido (C), pH (D), vazão específica de gás (E) e atividade de pectinases totais (F), em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de agitação mecânica equipado com três impelidores do tipo Rushton e diferentes aspersiones de gás



Condições de processo: (I) impelidores R R R e aspersor do tipo ferradura (—▼—); (II) impelidores R R R e aspersor do tipo aquário (—□—); (III) impelidores R R R e aspersor do tipo aquário, em meio com pectina desesterificada (—▲—)

A produção de pectinases não esteve diretamente associada ao perfil cinético de crescimento microbiano, assim como relatado por Fontana *et al.* (2009), ou seja, nas primeiras horas de cultivo houve alto crescimento microbiano com mínima formação de pectinases e queda concomitante do pH para, em seguida, a partir de cerca de 36h, haver aumento da velocidade de formação de pectinases até o término de processo, em aproximadamente 96h. Todavia, o tempo para atingir a máxima atividade de pectinases foi menor nas condições II (87h) e III (86h) em relação à condição I (96h). Os maiores títulos em produtividade

volumétrica, ligeiramente semelhantes, foram nas condições I (0,26U/mL/h) e II (0,29U/mL/h) e superiores à condição III (0,15U/mL/h). Esses fatos podem estar relacionados ao tempo de manutenção da máxima frequência dos agitadores utilizada para controlar a concentração de oxigênio no valor mínimo de 30% da saturação (FONTANA *et al.*, 2009): em I, o processo foi mantido a 700rpm por 23h; em II, por 8,5h, ambos na fase exponencial de crescimento microbiano. Porém, não explicaria o comportamento obtido na condição III, em que a máxima frequência dos agitadores foi apenas por 5h. Com a quebra da cadeia polimérica, tem-se a liberação de ácido galacturônico. Conseqüentemente, a taxa de diminuição da atividade enzimática deveria ser superior se, por exemplo, fosse utilizada a pectina esterificada (LOCATELLI *et al.*, 2010). Todavia, em III, a indução para produção enzimática foi inferior às outras condições experimentais.

Tabela 11 – Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica equipado com aspersor de gás do tipo ferradura (condição I), aquário (condição II) e aquário com utilização de pectina desesterificada (condição III)

Parâmetro	Condição I	Condição II	Condição III
$X_{\text{máx}}$ [g/L]	7,73(\pm 0,57)	6,49(\pm 0,01)	10,14(\pm 1,25)
$t_{X,\text{máx}}$ [h]	64	44	71
S_o [g/L]	8,98(\pm 1,15)	7,05(\pm 0,22)	9,52(\pm 0,29)
S_{cons} [g/L]	7,56	4,99	8,59
$P_{\text{máx}}$ [U/mL]	24,60	25,53	13,36
$t_{P,\text{máx}}$ [h]	96	87	86
$Y_{P/X}$ [U/mg]	3,18	3,93	1,14
$Y_{P/S}$ [U/mg]	3,25	4,90	1,66
$Y_{X/S}$ [g/g]	1,43	1,77	1,55
p_v [U/mL/h]	0,26	0,29	0,15
$\mu_{X,\text{máx}}$ [h^{-1}]	0,21	0,20	0,24
K_{La} [h^{-1}]	9,00	16,56	29,88
$f_{\text{máx}}$ [min^{-1}]	700	700	700
$t_{f,\text{máx}}$ [h]	23	8,5	5

$X_{\text{máx}}$ – máxima concentração de biomassa celular; $t_{X,\text{máx}}$ – tempo em que ocorre $X_{\text{máx}}$; S_o – concentração inicial de ART; S_{cons} – consumo total de ART; $P_{\text{máx}}$ – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\text{máx}}$ – tempo em que ocorreu $P_{\text{máx}}$; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; $\mu_{X,\text{máx}}$ – velocidade específica de crescimento celular máxima; K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio isento de células, medido nas condições iniciais de processo (300rpm, 0,57L/L/min); $f_{\text{máx}}$ – máxima frequência dos agitadores; $t_{f,\text{máx}}$: tempo de permanência de $f_{\text{máx}}$.

5.2 ANÁLISE DO PROCESSO EM BIORREATOR AIRLIFT

A seguir são apresentados e discutidos os resultados referentes ao processo de transferência de oxigênio em biorreator de bancada do tipo *airlift* de circulação interna. Posteriormente, é discutido o processo de produção de pectinases.

5.2.1 Ensaios de transferência de oxigênio gás-líquido

A seguir são apresentados os resultados referentes ao processo de transferência de oxigênio em biorreator de bancada do tipo *airlift*, em água e em solução de pectina 2% (m/v).

5.2.1.1 Ensaios com água destilada

Ensaios preliminares em água destilada foram feitos com os aspersores mostrados na Figura 12, além do aspersor pedra sinterizada. O volume do líquido foi de 4L. Na condição em que foi utilizado o funil sinterizado de $\phi = 5\text{cm}$, utilizou-se o tubo interno 2 (Tabela 3), de modo a garantir a circulação do fluido sem que houvesse a passagem das bolhas de gás pela região do *downcomer*. Nas demais condições, optou-se por utilizar o tubo interno 1 (Tabela 3). Os resultados estão mostrados na Tabela 12.

Os valores de $K_L a$ mostrados na Tabela 12 variam entre aproximadamente 10 e 80h^{-1} com o aumento do vazão volumétrica de gás de 0,25 para 0,75L/L/min. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Fontana *et al.* (2009), que estimou valores de $K_L a$ em água entre 40 e 100h^{-1} com o aumento do fluxo específico de gás de 0,5 para 2,0L/L/min.

Tabela 12 – Coeficiente volumétrico de transferência de massa [h^{-1}], em água destilada quando, utilizados diferentes tipos de aspersores de gás, em *airlift*

Aeradores	Vazão volumétrica de gás [L/L/min]				
	0,25	0,37	0,50	0,63	0,75
A1	40,68	51,84	58,68	81,36	82,44
A2	19,80	24,48	32,04	48,96	51,12
A3	13,32	18,36	22,68	23,04	35,82
A4	14,40	20,16	25,92	27,00	33,84

Tipos de aeradores: A1: pedra sinterizada; A2: latão; A3: funil sinterizado $\phi = 4\text{cm}$; A4: funil sinterizado $\phi = 5\text{cm}$.

Os valores mais altos de K_{La} foram obtidos com o aspersor pedra sinterizada, o qual foi utilizado nos ensaios subsequentes. Os demais aspersores não foram reutilizados devido a alguns problemas, que são discutidos na sequência:

- a grande dimensão e a desuniformidade da dispersão das bolhas de gás aspergidas pelo aerador de latão não favoreceram a circulação do fluido nem o transporte de gás ao longo do biorreator;
- os baixos valores de K_{La} com a utilização de ambos os funis (Tabela 12);
- com o aumento do diâmetro da região onde é aspergido o gás (*riser*), tem-se uma diminuição do espaço entre essa região e o *downcomer*, levando a maiores velocidades de descida do gás (FONTANA *et al.*, 2009). Essa premissa levou à utilização do sistema com o tubo interno 2 (Tabela 3) e o funil sinterizado de $\varphi = 5\text{cm}$, o que proporcionou a obtenção de mais altas velocidades de circulação do fluido. Porém, essa configuração, possivelmente, não favoreceria a circulação do meio de fermentação, sugerindo a possibilidade de formação de zonas estagnadas no *downcomer*.

Vários relatos na literatura indicam a utilização de um sistema de injeção de ar na região central do *airlift* (FONTANA *et al.*, 2009; BANNARI *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2011; RITTER *et al.*, 2013). Entretanto, pouco se conhece sobre o sistema de agitação quando a aspersão do gás acontece na região anular do *airlift*, gerando uma alta recirculação do fluido na região do *riser*, como relata Colombet *et al.* (2013). Com isso, os resultados do efeito da vazão específica de gás, do volume do fluido e dos aeradores pedra sinterizada, aquário com aspersão do gás na região central (interna) e na região anular (externa) sobre a transferência de oxigênio em água destilada são mostrados na Figura 28.

Comparando os resultados da Figura 28 com aqueles obtidos no ensaio em biorreator de agitação mecânica (Figura 15), nota-se que o efeito da frequência dos agitadores sobre o K_{La} é superior ao da vazão específica de gás em *airlift* – único parâmetro responsável pela circulação e mistura do fluido. Os valores de K_{La} com o aumento da vazão volumétrica do gás de 0,40 para 1,59L/L/min, em *airlift*, encontram-se entre 35 e 110h⁻¹, aproximadamente. Em STR, apesar da semelhança dos resultados em termos de limite inferior, o mesmo não é verificado na faixa superior, pois, em frequências intermediárias (entre 400 e 600rpm), o transporte de massa equivale àquele em *airlift*, ou seja, tem-se ainda a possibilidade do aumento da frequência dos agitadores, indicando, assim, a intensa limitação do *airlift* em termos de transporte de oxigênio, o que está de acordo com estudos de Fontana *et al.* (2009).

A transferência de massa proporcionada pelos aspersores pedra sinterizada e de aquário, com sistema sendo operado com fluxo ascensional do tubo interno foi semelhante

nas três condições de variação de volume do fluido, com pequenas diferenças entre as condições B e C. Os valores de K_{La} para o aerador pedra sinterizada foram superiores para qualquer vazão específica de gás, possivelmente por causa da maior velocidade de circulação (V_d) da água no *downcomer* em relação ao aspersor aquário (interno), como pode ser observado na maioria dos casos apresentados na Figura 29 e, concomitantemente, devido ao menor tempo de circulação (t) (Figura 30). Pelas Figuras 29 e 30, quando comparados os valores das velocidades e tempos de circulação atingidos com os aspersores pedra sinterizada e aquário (interno), verifica-se que os maiores valores de “ V_d ” e os menores valores de “ t ”, para qualquer variação de volume e de vazão, ocorreram quando utilizado o aspersor pedra sinterizada (0,16cm/s e 8s, valores médios aproximados). Com o aspersor aquário (interno), atingiram-se valores médios aproximados de 0,08cm/s e 13s. Esses resultados estão de acordo com relatos de Ritter (2009), que explica que maiores velocidades de circulação favorecem a transferência de oxigênio.

Entretanto, principalmente nas condições B e C e em altas vazões de gás, os melhores resultados foram atingidos com a utilização do aspersor aquário (externo) – cerca de $100h^{-1}$ (Figura 28) – mesmo apresentando velocidades de circulação estatisticamente iguais à maioria das demais condições (Figura 29). Colombet *et al.* (2013) relatam que a medida de transferência de massa leva em conta a média global do tamanho de bolhas presentes no reator, incluindo até mesmo aquelas que não são detectadas por sondas. Para altas vazões de gás, então, o K_{La} tende a atingir valores superiores, possivelmente, por causa do importante papel que bolhas pequenas têm no transporte de massa e no efeito aparente da recirculação das bolhas que ficam presas no *riser* – no caso desse ensaio e também do estudo dos mesmos autores, o *riser* corresponde à região externa ao tubo interno – aumentando seu tempo de residência e, conseqüentemente, levando ao melhor transporte de massa.

5.2.1.2 Ensaio com solução de pectina

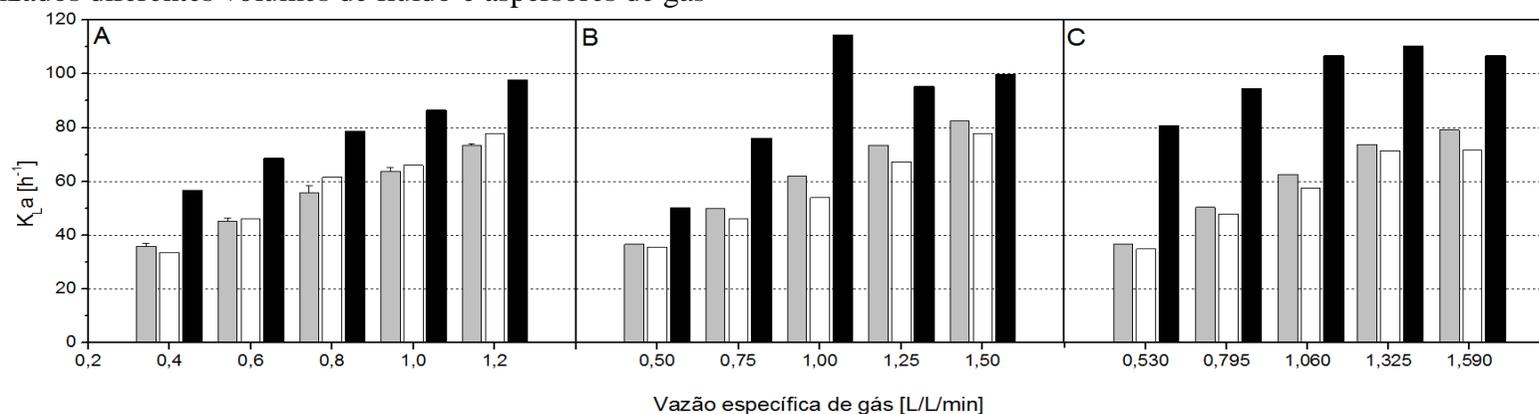
Os resultados do efeito da vazão específica de gás, do volume do fluido e dos aeradores pedra sinterizada, aquário (interno e externo) sobre a transferência de oxigênio em solução de pectina 2%(m/v), em *airlift*, são mostrados na Figura 31.

Ao contrário do que acontece com a água, com a solução do polissacarídeo não é observado o aumento substancial do K_{La} com o aumento da vazão específica do gás, mostrando, mais uma vez, a grande influência da viscosidade sobre o K_{La} . Ritter *et al.* (2013) também expõem que a substituição de substâncias menos viscosas (sorbitol) por mais viscosas

(celulose) resulta em um meio capaz de transferir massa com mais dificuldade em biorreatores *airlift* de circulação interna. Os mesmos autores explicam que o aumento da vazão específica do gás resulta em velocidades de circulação do fluido mais elevadas, aumentando a turbulência dentro do biorreator e favorecendo a coalescência das bolhas. Ao verificar os resultados apresentados na Figura 32, pode-se inferir que os mesmos estão de acordo com esse estudo. Apesar dos altos desvios padrão, o que se nota é uma tendência ao aumento significativo de V_d da condição B-pedra sinterizada-1,50L/L/min ($0,031 \pm 0,004$ cm/s) para C-pedra sinterizada-1,59L/L/min ($0,04 \pm 0,007$ cm/s), apesar do processo de transferência de oxigênio com esse tipo de aspersor ser o menos eficaz.

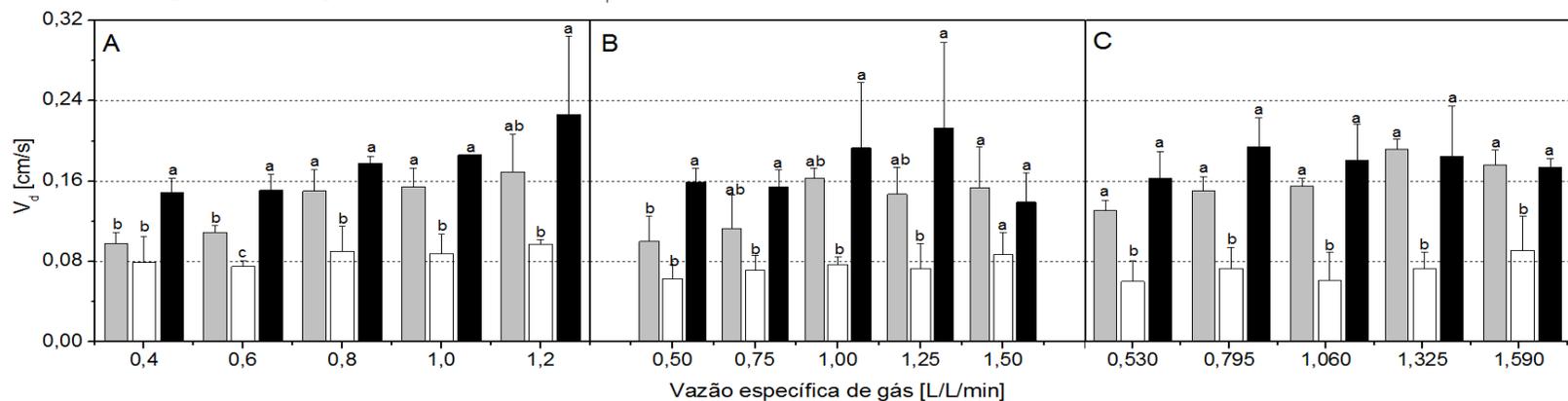
Em *airlift* contendo água destilada, os valores de $K_L a$ encontram-se entre 35 e 110h^{-1} (Figura 28), aproximadamente, com o aumento da vazão específica de gás; em solução de pectina 2%(m/v) (Figura 31), esse incremento é somente de 5 para 35h^{-1} (com exceção da condição C-1,590L/L/min-aquário (externo), que atinge 60h^{-1}). Adicionalmente, os resultados inferiores foram obtidos com o aspersor pedra sinterizada (entre 5 e 10h^{-1}) e os melhores foram com o aspersor aquário (externo), cerca de quatro vezes mais que a pedra sinterizada, confirmando também, mais uma vez, os relatos de Colombet *et al.* (2013), explanados anteriormente.

Figura 28 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator *airlift* em função da vazão específica de gás, em água destilada, quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás



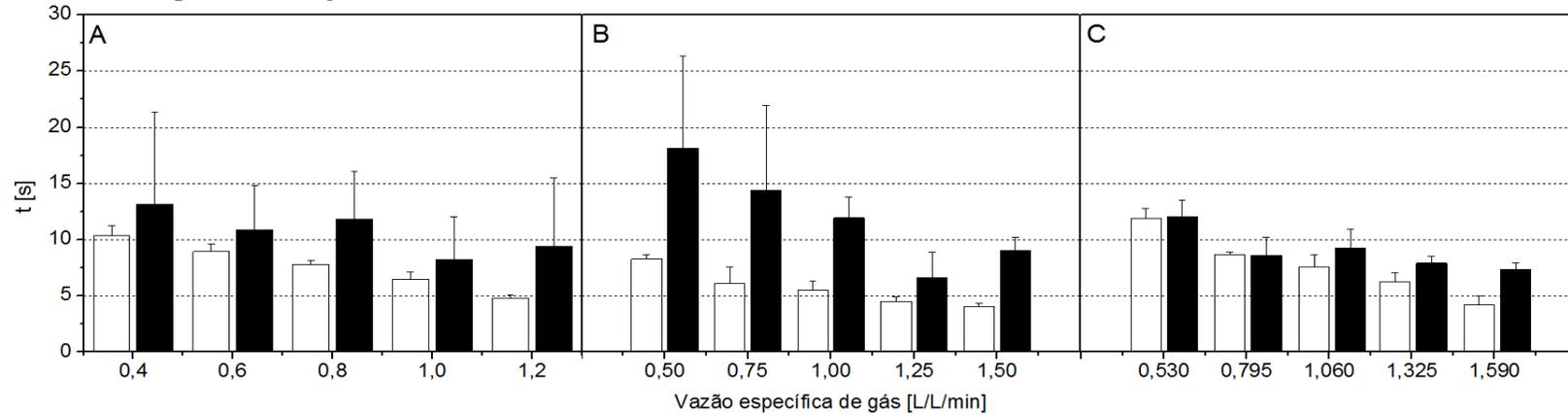
(A): 5L; (B): 4L; (C): 3,75L. Aspersores de gás: (■) pedra sinterizada; (□) aquário (interno); (■) aquário (externo).

Figura 29 – Velocidade de circulação da água destilada em biorreator *airlift* em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás



(A): 5L; (B): 4L; (C): 3,75L. Aspersores de gás: (■) pedra sinterizada; (□) aquário (interno); (■) aquário (externo).

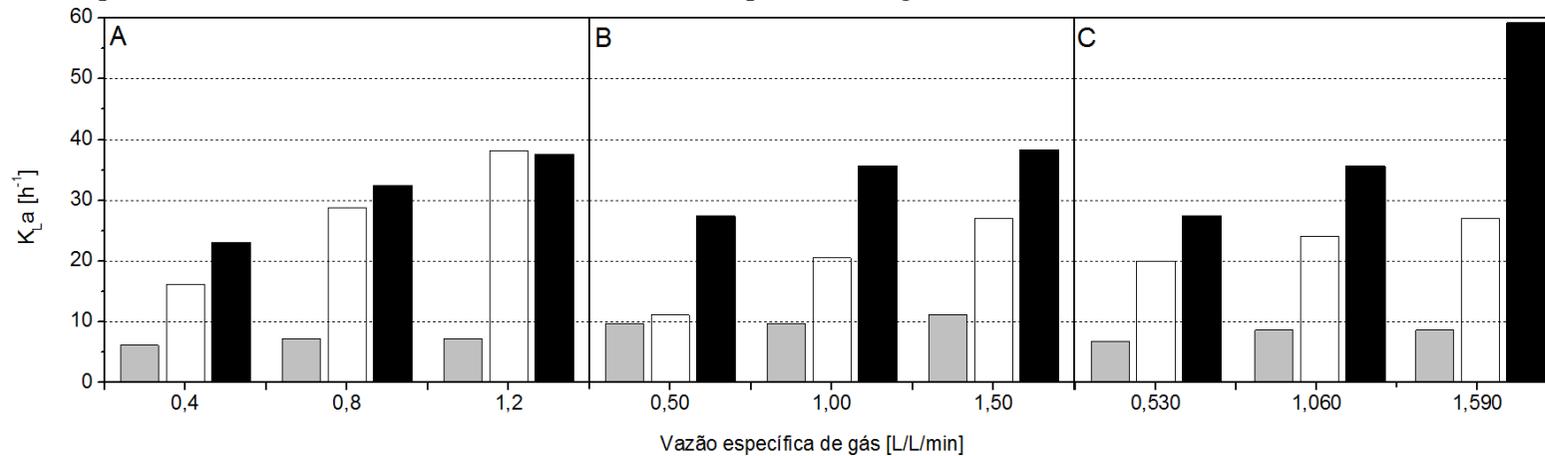
Figura 30 – Tempo de circulação da água destilada em biorreator *airlift* em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás



(A): 5L; (B): 4L; (C): 3,75L. Aspersores de gás: (□) pedra sinterizada; (■) aquário (interno).

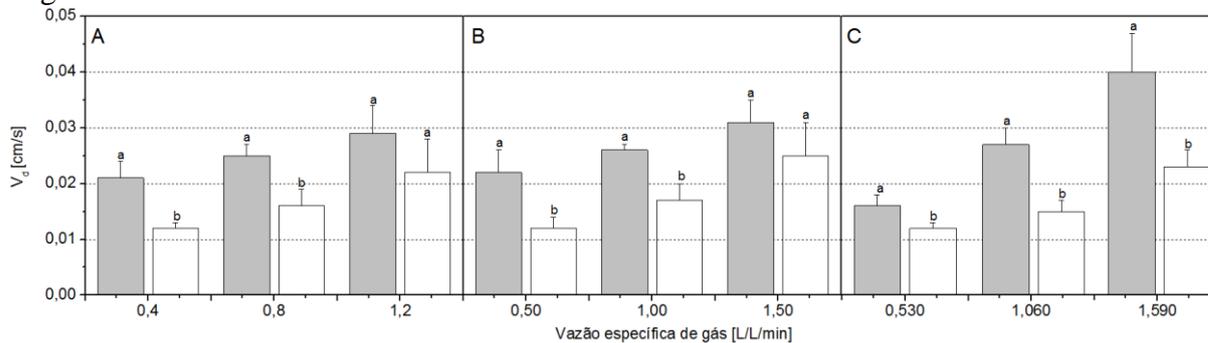
A análise estatística mostrou que para todas as amostras não houve diferenças significativas. Não foi possível adquirir dados de tempo de circulação com o aspersor aquário (externo) devido a problemas de circulação das esferas de alginato.

Figura 31 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator *airlift* em função da vazão específica de gás, em solução de pectina 2% (m/v), quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás



(A): 5L; (B): 4L; (C): 3,75L. Aspersores de gás: (■) pedra sinterizada; (□) aquário (interno); (■) aquário (externo).

Figura 32 – Velocidade de circulação da solução de pectina 2%(m/v) em biorreator *airlift* em função da vazão específica de gás quando utilizados diferentes volumes de fluido e aspersores de gás



(A): 5L; (B): 4L; (C): 3,75L). Aspersores de gás: (■) pedra sinterizada; (□) aquário (interno). Não foi possível adquirir dados de tempo de circulação com o aspersor aquário (externo) devido a problemas de circulação das esferas de alginato.

5.2.2 Avaliação do processo de produção de pectinases

Por se tratar de um equipamento cuja geometria é expressivamente distinta do biorreator de agitação mecânica e tendo-se como base de análise de processo os estudos realizados por Fontana *et al.* (2009), que utilizou o mesmo equipamento para produzir poligalacturonases, ensaios preliminares para produção de pectinases foram realizados em 4,5L de meio de cultivo. Porém, devido a problemas de evaporação intensa causados pelo arraste excessivo de água a altas vazões volumétricas de gás, nos ensaios posteriores optou-se por utilizar 5L de meio de cultivo, além de acoplar um condensador externamente ao reator.

As condições de processo foram as mesmas dos ensaios realizados em biorreator de agitação mecânica (pH inicial ajustado em 4,0 com queda natural até 2,7). A vazão volumétrica do gás no início do processo foi de 0,40L/L/min.

Foram realizados três ensaios. No primeiro (condição I) levou-se em consideração as melhores condições de transferência de massa ao utilizar o aspersor aquário alocado na região externa do tubo interno, tanto em água quanto em solução de pectina 2%(m/v) (item 5.1.2). No segundo (condição II), apesar de os melhores resultados apresentados quando utilizado o aspersor aquário – alocado na região interna do tubo interno – sobre a pedra sinterizada (item 5.1.2.1 e Figura 21), optou-se por empregar o segundo aerador, o qual se mostrou mais eficaz quanto à velocidade de circulação da solução do polissacarídeo (Figura 21), sabendo que a viscosidade é um parâmetro importante a ser considerado em cultivos fúngicos, com intensas mudanças no comportamento reológico. No terceiro (condição III), optou-se por utilizar a pectina desesterificada, cujos testes preliminares são relatados no item 5.3 e as razões por seu

emprego serem as mesmas expostas no item 5.4.1. A escolha pelo aspersor do tipo aquário nessa condição se deu pelos mesmos motivos explicados para a condição A.

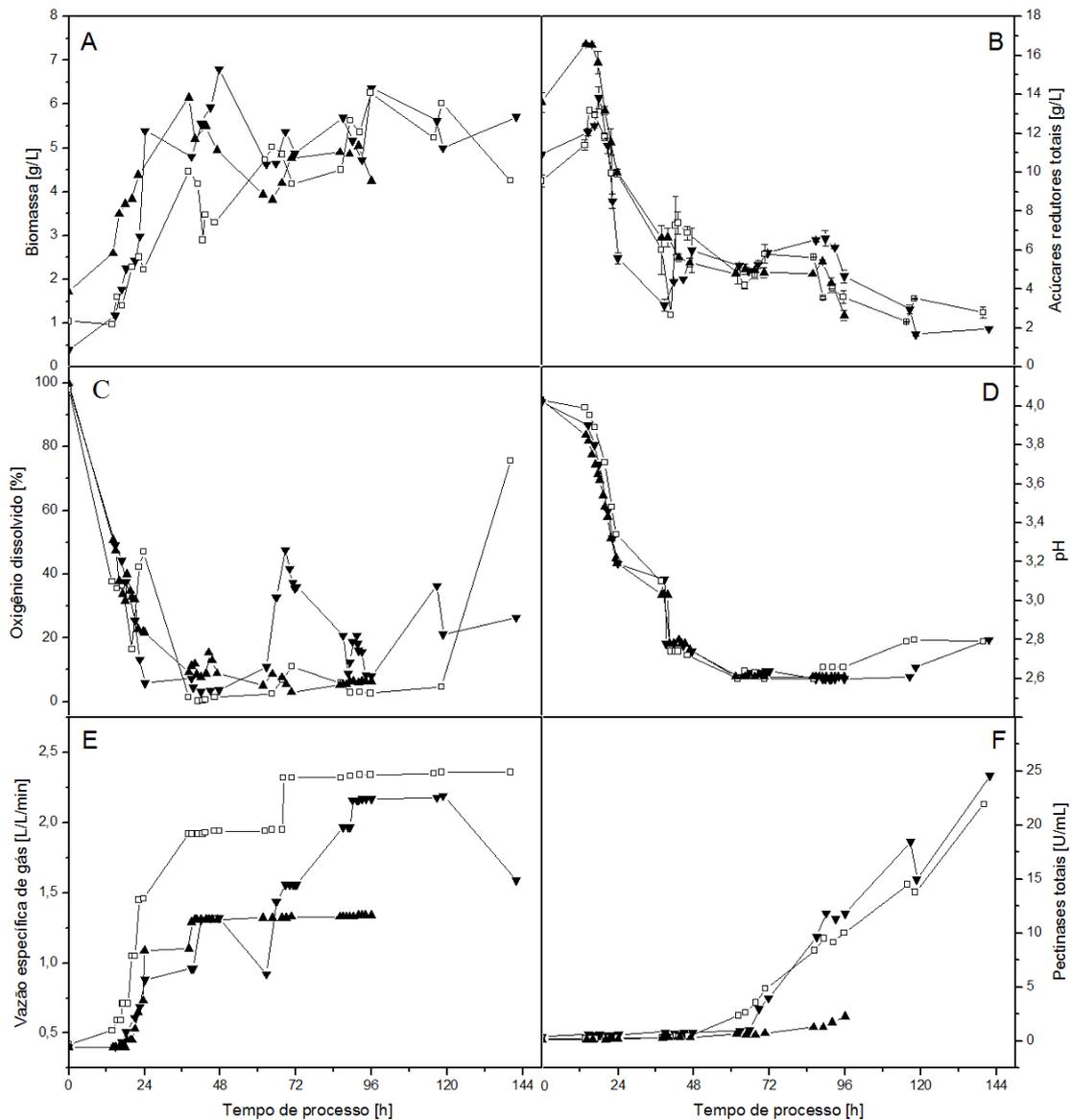
Os perfis de crescimento celular, consumo de substrato, oxigênio dissolvido, pH, atividade enzimática e vazão específica de gás são mostrados na Figura 33. Os resultados gerais desses cultivos são apresentados na Tabela 13.

Nas condições em que foram usados o aspersor do tipo aquário (externo) (condições I e III), os valores calculados para o K_{La} foram cerca de 3 vezes superior ao obtido na condição em que se utilizou o aspersor do tipo pedra sinterizada (condição II). Essa diferença, segundo Gluszczyk e Michalski (1994), pode estar relacionada ao tamanho das bolhas, que determina o tempo de residência do gás no meio de cultivo. No entanto, o aumento no número de bolhas pode acarretar na coalescência das mesmas, limitando o transporte de massa gasosa. Considerando que o tamanho das bolhas geradas pelo aspersor aquário são superiores às aquelas formadas pelo aspersor pedra sinterizada, o que pôde ser observado visualmente, e, ainda, que a quantidade de bolhas aspergidas pelo aerador pedra sinterizada é superior, sob mesmas vazões volumétricas de gás, os relatos dos autores mencionados são corroborados. Comparando esses valores com os resultados obtidos em solução de pectina 2%(m/v), mostrados na Figura 21, verifica-se que o valor do K_{La} para a condição I-0,40L/L/min-pedra sinterizada é $6,12h^{-1}$ e para a condição I-0,40L/L/min-aquário (externo) é $23,04h^{-1}$, o que está de acordo com os dados desse ensaio, haja vista que a presença de outros componentes, além do indutor, também têm influência na variação do K_{La} .

Os três ensaios apresentaram uma fase *lag* de aproximadamente 10h, semelhante aos obtidos nos ensaios em STR, anteriormente apresentados e discutidos, e nos relatos de Fontana *et al.* (2009), acerca do cultivo de *A. oryzae* em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*. Essa etapa do processo foi caracterizada pela circulação e mistura do meio de cultivo sem formação de zonas estagnadas (Figura 34A). Após esse período, constatou-se um intenso aumento da biomassa na forma de *pellets* (Figura 34B a E), sendo atingidas concentrações celulares semelhantes até aproximadamente 39h de cultivo nas condições I e II (4,80g/L e 4,46g/L, respectivamente), porém inferiores à condição III (6,14g/L). A partir desse período, constatou-se certa estabilidade da biomassa, correspondendo à fase estacionária de crescimento microbiano. Nesse ponto, a máxima concentração celular na condição I (6,80g/L) foi mais alta do que nas condições II (6,26g/L) e III (6,14g/L). Vale ressaltar que a inconstância dos dados de biomassa, pode ter sido em decorrência da formação de zonas estagnadas no reator – inicialmente, na base (Figura 34E) e, posteriormente, no *downcomer* (Figura 34F) – fato que corrobora os relatos de Rodríguez Porcel *et al.* (2005), que expõem

que, com a formação de *pellets*, os quais apresentam características morfológicas que lhes conferem maciez externa e compactação interna, tem-se o aumento da coalescência das bolhas e a limitação no transporte de massa. Vale ressaltar que o aspecto visual do cultivo apresentado na Figura 34 refere-se à condição III. Os outros ensaios discutidos neste capítulo apresentaram aspecto visual semelhante.

Figura 33 – Variação da biomassa celular (A), açúcares redutores totais (B), oxigênio dissolvido (C), pH (D), vazão específica de gás (E) e atividade de pectinases totais (F), em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator *airlift*, equipado com diferentes aspersores de gás



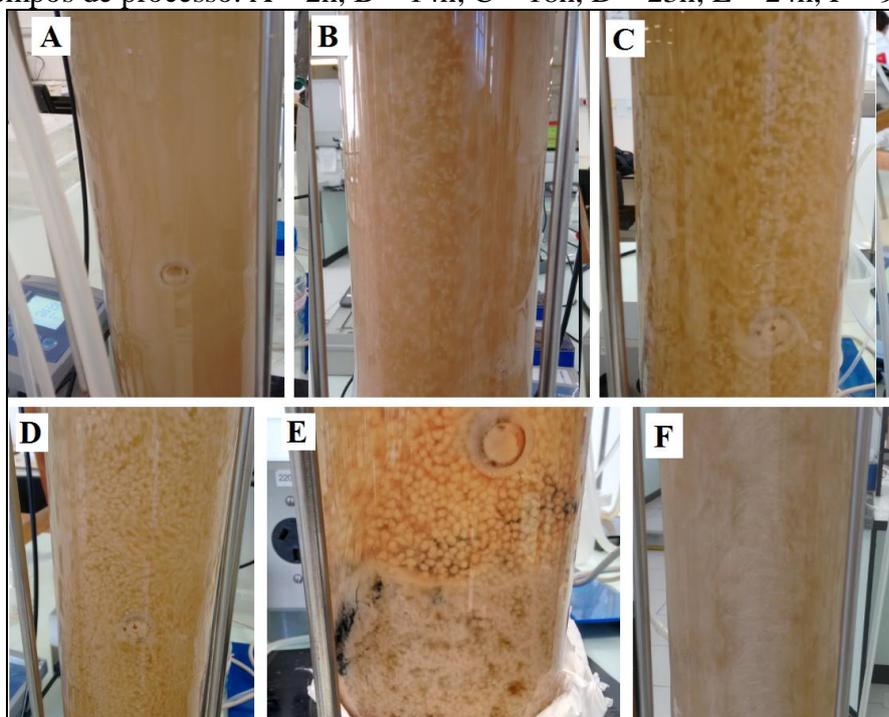
Condições de processo: (I) aspersor do tipo aquário, alocado na região externa do tubo interno (—▼—); (II) aspersor pedra sinterizada (—□—); (III) aspersor do tipo aquário, alocado na região externa do tubo interno em meio com pectina desesterificada (—▲—)

Tabela 13 – Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator *airlift* equipado com aspersor de gás do tipo aquário (externo) (condição I), pedra sinterizada (condição II) e aquário (externo) com utilização de pectina desesterificada (condição III)

Parâmetro	Condição I	Condição II	Condição III
$X_{\text{máx}}$ [g/L]	6,80(\pm 0,01)	6,26(\pm 0,13)	6,14(\pm 0,01)
$t_{X,\text{máx}}$ [h]	48	96	38
S_0 [g/L]	10,92(\pm 0,02)	9,55(\pm 0,29)	13,59(\pm 0,51)
S_{cons} [g/L]	8,94	6,74	10,94
$P_{\text{máx}}$ [U/mL]	24,61	21,94	2,29
$t_{P,\text{máx}}$ [h]	142	140	96
$Y_{P/X}$ [U/mg]	3,62	3,50	0,37
$Y_{P/S}$ [U/mg]	2,75	3,26	0,21
$Y_{X/S}$ [g/g]	1,38	1,05	0,88
p_v [U/mL/h]	0,17	0,16	0,02
$\mu_{x,\text{máx}}$ [h^{-1}]	0,11	0,10	0,06
K_{La} [h^{-1}]	21,96	7,20	18,00
$Q_{v,\text{máx}}$ [L/L/min]	2,17	2,32	1,34
$t_{Q_v,\text{máx}}$ [h]	29	72	57

$X_{\text{máx}}$ – máxima concentração de biomassa celular; $t_{X,\text{máx}}$ – tempo em que ocorre $X_{\text{máx}}$; S_0 – concentração inicial de ART; S_{cons} – consumo total de ART; $P_{\text{máx}}$ – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\text{máx}}$ – tempo em que ocorreu $P_{\text{máx}}$; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; $\mu_{x,\text{máx}}$ – velocidade específica de crescimento celular máxima; K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio isento de células, medido na condição inicial de processo (0,40L/L/min); $Q_{v,\text{máx}}$ – máxima vazão específica de gás; $t_{Q_v,\text{máx}}$: tempo de permanência de $Q_{v,\text{máx}}$.

Figura 34 – Aspecto de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator *airlift* (condição III), em diferentes tempos de processo. A – 2h; B – 14h; C – 18h; D – 23h; E – 24h; F – 90h.



O perfil de consumo de açúcares redutores totais nos três ensaios foi semelhante. A redução mais intensa acompanhou o crescimento fúngico em sua fase exponencial e até cerca de 40 horas de cultivo, comportamento semelhante aos mostrados por Fontana *et al.* (2009) e já discutidos anteriormente por Meneghel (2013). Após esse período, a velocidade de consumo de ART tendeu a diminuir consideravelmente, havendo consumo de substrato superior na condição III (10,94g/L) com relação às condições I (8,94g/L) e II (6,74g/L), possivelmente devido à presença de substâncias redutoras as quais o fungo é incapaz de metabolizar (Fontana *et al.*, 2009) e também devido à formação de zonas estagnadas mais aparentes nas condições I e II. Outra explicação seria devido à hidrólise da pectina (condição III) no início do processo, que facilitaria o consumo de substrato na mesma condição, além de a viscosidade do meio ser inferior, auxiliando a mistura e o contato entre o microrganismo e o substrato.

O percentual de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *A. oryzae*, nas três condições testadas, decresceu rapidamente após a fase *lag*, como consequência do intenso metabolismo microbiano e das mudanças na viscosidade do meio devido à formação dos *pellets*. Nas condições I e III, até 24h de cultivo, esse percentual decaiu gradualmente até 10-20% da saturação. Entretanto, na condição I, manteve-se em níveis inferiores a 10% até às 48h, o que não foi observado na condição III, que, a partir das 40h de cultivo, mesmo com o aumento da vazão específica de gás até 1,34L/L/min, manteve-se abaixo de 30% da saturação. Já na condição I, foi possível controlá-lo entre 10 e 50% da saturação durante praticamente o restante do processo, através do controle da vazão específica de gás, atingindo valor máximo ($Q_{v,máx}$) em 2,17L/L/min (Tabela 13). Em II, foi possível controlar esse valor em torno de 30% da saturação (FONTANA *et al.*, 2009) com o aumento da vazão específica de gás até 1,46L/L/min, até 24h de cultivo. Todavia, mesmo com o aumento da vazão específica de gás até $Q_{v,máx}$ igual a 2,32L/L/min (Tabela 13) – valor superior à condição A – a concentração de oxigênio manteve-se em níveis inferiores a 10%, somente aumentando no final do cultivo. De acordo com Jin *et al.* (1999), o aumento da concentração de biomassa de *A. oryzae* ocorre com o aumento da vazão específica de gás. Todavia, os autores relatam que danos ao micélio ocorreram para vazões acima de 1,6L/L/min. Nestes ensaios em *airlift*, foi necessário aumentar Q_v na tentativa de manter a concentração crítica de oxigênio, o que possivelmente acarretou no cisalhamento fúngico.

Em todos os cultivos, o pH do meio sofreu uma queda característica até aproximadamente 24h, em ambos os ensaios, atingindo valores próximos a 3,20. Em seguida, até 39h de processo, esses valores mantiveram-se praticamente inalterados, não alcançando o

valor mínimo de 2,70. Fontana *et al.* (2009) apresentou resultados semelhantes, mostrando que o cultivo de *A. oryzae* em biorreatores *airlift* de circulação interna e externa atingiu valores mínimos de pH de 2,92 e 3,28, respectivamente. Outra explicação seria com relação ao próprio comportamento do crescimento microbiano na forma de *pellets*, que impede que a circulação do fluido aconteça naturalmente, dificultando o metabolismo microbiano e a liberação de compostos orgânicos, como relatado anteriormente (MOORE-LANDECKER, 1996). Após esse período, então, o pH foi forçado a cair até 2,70($\pm 0,10$), com a adição de HCl 2,0mol/L, e foi controlado automaticamente nesse patamar até o final do processo, de modo a auxiliar no processo de produção enzimática.

Com relação à produção de pectinases, o fator de produção específica foi cerca de nove vezes superior nas condições I e II quando comparadas com a condição III. Todavia, o fator de conversão de substrato em produto foi aproximadamente 18% mais alto na condição II em relação à condição I e quinze vezes superior na condição II em relação à condição III. A conversão substrato em células foi superior em I, atingindo títulos aproximados de 31% superiores em relação a II e 56% em relação a III. Esses dados sugerem que tanto a obtenção de pectinases quanto a formação de biomassa fúngica não são proporcionalmente equivalentes e dependem, possivelmente, da variação mais acentuada do pH do meio em *airlift*, como relatam Fontana *et al.* (2009). Malvessi e Silveira (2004) também apresentam relatos que corroboram esses resultados, mostrando que as mais altas atividades enzimáticas ocorreram quando o pH atingiu o patamar de 2,70. O perfil de produção enzimática apresentado na Figura 33 evidencia que, nas três condições, não houve associação cinética com o crescimento celular: foram obtidos níveis máximos de 24,61U/mL em 142h de processo na condição I; 21,94U/mL em 140h de processo em II e somente 2,29U/mL em 96h de processo em III. Nesta última condição, a baixa produção enzimática possivelmente ocorreu devido à hidrólise da pectina no início do processo e liberação de ácido galacturônico. Conseqüentemente, a taxa de diminuição da atividade enzimática seria superior se, por exemplo, fosse utilizada a pectina esterificada, corroborando relatos de Locatelli *et al.* (2010). Conseqüentemente, a produtividade volumétrica (p_v) foi análoga nas condições I e II e superiores à condição III, por causa da baixa produção enzimática, somada ao tempo de processo mais curto desta última.

A seguir, são mostrados alguns valores de atividade enzimática obtidas em ensaios em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*, encontrados na literatura, a título de avaliação comparativa com os resultados deste trabalho.

Fontana *et al.* (2009) utilizaram meio WBE (*wheat bran extract*), composto por extrato de farelo de trigo, para a produção de endo-poligalacturonases (endo-PG) e obteve 91,3U/mL de atividade enzimática em biorreator de agitação mecânica (STR), valor superior ao obtido em *airlift* de circulação interna (86,2U/mL). Ao adaptar o meio de cultivo, utilizando 20g/L de pectina, houve melhora na atividade da enzima em ensaio em batelada (125U/mL). Posteriormente, ao utilizar pectina parcialmente hidrolisada, o incremento na atividade enzimática foi cerca de 19% (149U/mL). Apesar de a transferência de oxigênio ter sido satisfatória em *airlift*, valores superiores de endo-PG foram alcançados em STR (145U/mL) que em *airlift* de circulação interna (82,1U/mL).

Meneghel *et al.* (2014) obtiveram atividade de pectinases totais de 43U/mL em cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301, em STR, quando o pH foi mantido em 4,0 somente durante o período de crescimento exponencial microbiano e, após, controlado em 2,7, favorecendo tanto a produção enzimática quanto sua estabilidade. Já quando a concentração de oxigênio não foi limitante para o microrganismo, o incremento na atividade enzimática foi quase três vezes mais alto (120U/mL).

Também é válido dizer que esses resultados são comparáveis com estudos semelhantes e que, dessa forma, fazem referência a controle de processos biotecnológicos e composições de meio de cultivo que não são exatamente iguais aos processos analisados neste trabalho.

Sendo assim, mesmo que as atividades enzimáticas deste trabalho sejam inferiores àquelas descritas na literatura, ambos os sistemas – *airlift* e STR – têm potencial uso na produção de pectinases. Além disso, esses equipamentos podem ser utilizados para projetos de aumento de escala. O sistema *airlift*, por sua vez, tem a vantagem da previsão de menores custos de instalação e de operação.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, abaixo são apresentadas as principais conclusões.

Para os ensaios em biorreator de agitação mecânica:

- a frequência dos impelidores, e sua interação com o fluido presente no reator, é o principal parâmetro de processo com respeito ao transporte do oxigênio, mostrando, sob este aspecto, influência maior que a vazão volumétrica de ar e as configurações de impelidores e aeradores testadas;
- entre as combinações testadas, a combinação de fatores que mais teve influência positiva no transporte de oxigênio em água destilada, com relação ao K_{La} , inclui o uso de três impelidores Rushton, aspensor de ar do tipo aquário e altas frequências dos agitadores (700rpm) e vazões volumétricas de gás (1,71L/L/min);
- por meio de planejamento fatorial, é possível concluir que o fator mais influente sobre o transporte de oxigênio é o tipo de fluido empregado, mostrando a primordial importância da viscosidade nessa análise;
- os modelos empíricos propostos por Miller (1974), Wang *et al.* (1979) e Badino Jr. *et al.* (2001) servem de base para a definição de correlações que melhor representem o processo em estudo, tanto em água quanto em solução de pectina 2%(m/v); porém, as constantes destes modelos empíricos precisaram ser modificadas para permitir um ajuste adequado dos dados experimentais;
- para cultivo de *A. oryzae*, a utilização do aspensor do tipo aquário e o uso de três impelidores de seis pás planas (Rushton) são mais apropriados tanto para o transporte de oxigênio quanto para a redução do tempo de processo sob altas frequências dos impelidores necessário para proporcionar adequadas concentrações de O_2 dissolvido para o cultivo;
- os níveis elevados de crescimento microbiano não se refletem na produção enzimática;
- o uso de pectina desesterificada no processo, embora leve ao aumento da transferência de oxigênio para o meio líquido, não é favorável à produção enzimática.

Para os ensaios em biorreator *airlift*:

- o aspensor aquário posicionado externamente ao tubo interno é o que proporciona o melhor transporte do oxigênio dentre os aeradores utilizados, tanto em água quanto em solução de pectina;

- o aspersor aquário posicionado externamente ao tubo interno auxilia no processo de produção de pectinases de *A. oryzae*, bem como no menor tempo para manter a máxima vazão específica do gás;
- o sistema *airlift*, por apresentar resultados comparáveis com o biorreator de agitação mecânica, tem potencial uso na produção de enzimas em aumento de escala, além de ter a vantagem da previsão de menores custos de instalação e operação.

Como perspectivas para os próximos trabalhos, sugerem-se:

- o aprofundamento dos estudos acerca da transferência de massa para o meio de cultivo de produção de pectinases, com variações nas concentrações do indutor e demais componentes da formulação;
- a validação dos modelos empíricos adaptados a partir da literatura para outras condições operacionais com respeito a geometrias distintas de aspersores e impelidores;
- a avaliação dos modelos empíricos desenvolvidos para analisar a questão da transferência de oxigênio durante o processo fermentativo, incluindo na discussão a influência da concentração de biomassa fúngica;
- o desenvolvimento, ou adaptação, de expressões matemáticas que descrevam a transferência de oxigênio em reatores do tipo *airlift* com diferentes configurações.

7 REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; SCHAFFIE, M.; PETERSEN, J.; SCHIPPERS, A.; RANJBAR, M. Conventional and electrochemical bioleaching of chalcopyrite concentrates by moderately thermophilic bacteria at high pulp density. **Hydrometallurgy**. v. 106, p. 84-92, 2011.
- ALBAEK, M. O.; GERNAEY, K. V.; HANSEN, M. S.; STOCKS, S. M. Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108, p. 1828-1840, 2011.
- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: an attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: a review. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1525-1537, 2011.
- BADINO JR., A.C.; FACCIOTTI, M.C.R; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (k_{La}) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**. v. 8, p. 111-119, 2001.
- _____. Improving k_{La} determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 75, p. 469-474, 2000.
- BANNARI, R.; BANNARI, A.; SELMA, B.; PROULX, P. Mass transfer and shear in an airlift bioreactor: using a mathematical model to improve reactor design and performance. **Chemical Engineering Science**. v. 66, p. 2057-2067, 2011.
- BEHIN, J. Modeling of modified airlift loop reactor with a concentric double-draft tube. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 88, p. 919-927, 2010.
- BLENKE, H. Loop reactors. **Advances in Biochemical Engineering**. v. 13, p. 121-214, 1979.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 151p, 1992.
- BRAVERMAN, J.B.S. **Bioquímica de los Alimentos**. México: El Manual Moderno, 358p, 1980.
- CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**. v. 344, p. 1879-1900, 2009.
- CAI, M.; ZHOU, X.; LU, J.; FAN, W.; NIU, C.; ZHOU, J.; SUN, X., KANG, L.; ZHANG, Y. Enhancing aspergillide: a production from a shear-sensitive and easy-foaming marine-derived filamentous fungus *Aspergillus glaucus* by oxygen carrier addition and impeller combination in a bioreactor. **Bioresource technology**. v. 102, p. 3584-3586, 2011.
- CERRI, M.O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. 2009. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CERRI, M.O.; BALDACIN, J.C.; CRUZ, A.J.G.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Prediction of mean bubble size in pneumatic reactors. **Biochemical Engineering Journal**. v. 53, p. 12-17, 2010.

CHEN, J.; YANG, R.; CHEN, M.; WANG, S.; LI, P.; XIA, Y.; ZHOU, L.; XIE, J.; WEI, D. Production optimization and expression of pectin releasing enzyme from *Aspergillus oryzae* PO. **Carbohydrate Polymers**. v. 101, p. 89-95, 2014.

CHIPETA, Z. A.; DU PREEZ, J. C; CHRISTOPHER. L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology**. v. 35, p. 587-594, 2008.

COKER, K. (2001). Fluid Mixing in Reactors. In: COKER, K. *Modeling of chemical kinetics and reactor design*. Elsevier: 2001. Cap. 7. p. 552-662.

COLOMBET, D.; COCKX, A.; GUIRAUD, P.; LEGENDRE, D. Experiments and modelling of a draft tube airlift reactor operated at high gas throughputs. **Chemical Engineering Science**. v. 104, p. 32-43, 2013.

COOPER, C.M.; FERNSTROM, G.A.; MILLER, S.A. Performance of agitated gas-liquid contactors. **Industrial and engineering chemistry**. v. 36, p. 504-509, 1944.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA. M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**. v. 112, p. 270-274, 2012.

CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A.; KONSTANKIEWICZ, K. Calcium effect on mechanical properties of model cell walls and apple tissue. **Journal of Food Engineering**. v. 102, p. 217-223, 2011.

DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Industrial Crops and Products**. v. 54, p. 302-309, 2014.

DORAN, P. M. Cap. 8 – Mixing. **Bioprocess Engineering Principles**. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2013. 919 p.

FAKHARI, M.E.; MORAVEJI, M.K.; DAVARNEJAD, R. Hydrodynamics and mass transfer of oily micro-emulsions in an external loop airlift reactor. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v. 22, p. 267-273, 2014.

FANG, S.; LI, J.; LIU, L.; DU, G.; CHEN, J. Overproduction of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Escherichia coli* by a two-stage glycerol feeding approach. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 10671-10678, 2011.

FASANO, J.B.; BAKKER A.; PENNEY W.R. Advanced impeller geometry boosts in liquid agitation. **Chemical Engineering**. p. 110-116, 1994.

FELSE, P.A.; PANDA, T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed. **Biochemical**

Engineering Journal. v. 4, p. 115-120, 2000.

FONTANA, R.C.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 4493-4498, 2009.

FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal- and external-loop airlift reactors. **Bioresource Technology**. v. 123, p. 157-163, 2012.

FOÛRT, I. On hydraulic efficiency of pitched blade impellers. **Chemical Engineering Research and Design**. Londres, v. 89, p. 611-615, 2011.

FOUST, A.S.; CLUMP, C.W.; WENZEL, L.A. **Princípios das operações unitárias**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 10, 670 p.

GARNA, H.; MABON, N.; NOTT, K.WATHELET, B.; PAQUOT, M.. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, v. 96, p. 477-484, 2006.

GARCIA-OCHOA; F. GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**. Nova Iorque, v. 27, p. 153-176, 2009.

GHARIB, J.; MORAVEJI, M.K.; DAVARNEJAD, R.; MALOOL, M.E. Hydrodynamics and mass transfer study of aliphatic alcohols in airlift reactors. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 91, p. 925-932, 2013.

GOGATE, P.R.; BEENACKERS, A.A.C.M.; PANDIT, A.B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**. Amsterdã, v. 6, p. 109-144, 2000.

GÓMEZ SANCHEZ, C.E.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, A.; AGUILAR OSORIO, G. Oxygen transfer coefficient and the kinetic parameters of exo-polygalacturonase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 in shake flasks and bioreactor. **Letters in Applied Microbiology**. v. 55, p. 444-452, 2012.

GOUVEIA, E.R; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 20, p. 363-374, 2003.

GLUSZCZ, P.; MICHALSKI, H. Cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot plant external loop air-lift bioreactor. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 14, p. 83-88, 1994.

HOLLAND, F. A.; BRAGG, R. Fluid flow for chemical engineers. 2ª edição, Edward Arnold, 1995.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. Londres, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JIROUT, T.; RIEGER, F. Impeller design for mixing of suspensions. **Chemical Engineering**

Research and Design. v. 89, p. 1144-1161, 2011.

JIN, B.; VAN-LEEUVEN, H.J.; PATEL, B. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry.** v. 34, p. 335-340, 1999.

JONES, S. M. J.; HARRISON, S. T. L. Aeration energy requirements for lipid production by *Scenedesmus* sp. in airlift bioreactors. **Algal Research.** In press. 2014.

KARIMI, A.; GOLBABAIEI, F.; MEHRNIA, M.R.; NEGHBAB, M.; MOHAMMAD, K.; NIKPEY, A.; POURMAND, M.R. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering.** v. 10, p. 1-9, 2013.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology.** v. 77, p. 215-227, 2001.

KING, E.E. Endo-polymethylgalacturonase of boll weevil larvae, *Anthonomus grandis*: an initiator of cotton flower bud abscission. **Journal of Insect Physiology.** v. 19, p. 2433-2437, 1973.

KULKARNI, A.V.; BADGANDI, S.V.; JOSHI, J.B. Design of ring and spider type spargers for bubble column reactor: experimental measurements and CFD simulation of flow and weeping. **Chemical Engineering Research and Design.** v. 87, p. 1612-1630, 2009.

KUMARESAN, T.; JOSHI, J.B. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. **Chemical Engineering Journal.** Amsterdã, v. 115, p. 173-193, out. 2006.

LIN, P.-J.; SCHOLZ, A.; KULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal.** v. 49, p. 230-220, 2010.

LIU, Y.; JIN, D.; LU, X.; HAN, P. Treatment of Dimethoate Aqueous Solution by Using Ultrasonic Airlift Loop Reactor. **Chinese Journal of Chemical Engineering.** v. 16, p. 361-364, 2008.

LOCATELLI, G.O.; SILVA, G.D.; FINKLER, L.; FINKLER, C.L.L. Hidrólise ácida e enzimática de pectina para crescimento celular de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*. Evidência, Joaçaba v. 10 n. 1-2, p. 89-104, janeiro/dezembro 2010.

LUO, L.; LIU, F.; XU, Y.; YUAN, J. Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with different spargers. **Chemical Engineering Journal.** v. 175, p. 494-504, jan. 2011.

LOUBIERE, K.; PRUVOST, J.; ALOUI, F.; LEGRAND, J. Investigations in an external-loop airlift photobioreactor with annular light chambers and swirling flow. **Chemical Engineering Research and Design.** v. 89, p. 164-171, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Artmed. pp. 1091, 2010.

MAIORANO, A.E. **Influência da concentração de inoculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido.** Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP, 1982.

_____. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido.** 1990. 262 f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

MALDONADO, R.R., BURKERT, J.F.M., MAZUTTI, M.A., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** v. 1, p. 147-151, jan. 2012.

MALVESSI, E. **Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso.** 2000. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2000.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archive of Biotechnology.** v. 47, p. 693-702, 2004.

MARCUS, L.; BARASH, I.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; FINKLER, A. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** v. 29, p. 325-336, 1986.

MENEGHEL, L. **Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, 2013.

MENEGHEL, L.; REIS, G.P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochemistry.** v. 49, p. 1800-1807, 2014.

MENEGHEL, L.; STUANI, F. H.; DE CESARO, T.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Formulação de meio de cultivo solúvel para a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 10., 2012, Blumenau. **Anais...**, Blumenau: FURB, 2012. 1 CD-ROM.

MERCHUK, J.C. Airlift Bioreactors: Review of Recent Advances. **The Canadian Journal of Chemical Engineering.** v. 81, p. 324-337, 2003.

MIAO, M.; ZHANG, Y.; SHU, L.; ZHANG, J.; KONG, Q.; LI, N. Development and characterization of the 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) aerobic degrading granules in sequencing batch airlift reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation.** p. 1-6, 2014.

MICHEL, B.J.; MILLER, S.A. Power requirements of gas-liquid agitated systems. **AIChE Journal**. v. 8, p. 262-266, 1962.

MICHELIN, M.; MOTA, A.M.O.; POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**. v. 80, p. 19-26, 2013.

MILLER, D.N. Scale-up of agitated vessels gas-liquid mass transfer. **AIChE Journal**. v. 20, p. 445-453, 1974.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31, 426, 1959.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of fungi**. New Jersey: Prentice Hall. 574 p. 1996.

MOO-YOUNG, M.; BLANCH, H.W. Transport phenomena and bioreactor design. **Basic Biotechnology**. v. 3, p. 135-151, 1989.

MYERS, K. J.; REEDER, M.; BAKKER, A. Agitating for success. *The Chemical Engineer*, p. 39-42, 1996.

NAJAFPOUR, G.D. Capítulo 6 – Bioreactor design. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Amsterdã, p. 142-169, 2007.

NAYAK, B.K.; ROY, S.; DAS, D. Biohydrogen production from algal biomass (*Anabaena* sp. PCC 7120) cultivated in airlift photobioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 39, p. 7553-7560, 2014.

PALIN, R.; GEITMANN, A. The role of pectin in plant morphogenesis. **Biosystems**. v. 109, p. 397-402, 2012.

PAN, X.; TU, T.; WANG, L.; LUO, H.; MA, R.; SHI, P.; MENG, K.; YAO, B. A novel low-temperature-active pectin methylesterase from *Penicillium chrysogenum* F46 with high efficiency in fruit firming. **Food Chemistry**. v. 162, p. 229-234, 2014.

PASHOVA, S.; SLOKOSKA, L.; KRUMOVA, E.; ANGELOVA, M. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, p. 535-540, 1999.

PATIL, S.R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 6. ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill. (McGraw-Hill Chemical Engineering Series), 1984.

PILZ, R.D.; HEMPEL, D.C. Mechanical stress on suspended particles in two- and three-phase airlift loop reactors and bubble columns. **Chemical Engineering Science**. v. 60, p. 6004-6012, 2005.

PIROUZI, A.; NOSRATI, M.; SHOJAOSADATI, S.A.; SHAKHESI, S. Improvement of mixing time, mass transfer, and power consumption in an external loop airlift photobioreactor for microalgae cultures. **Biochemical Engineering Journal**. v. 87, p. 25-32, 2014.

POLETTI, P. **Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, 2015.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A. B. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. Amsterdã, v. 23, p. 25-30, out. 2005.

QUEIROZ, R.B. **A influência do acabamento da superfície interna do tanque no número de potência de novos impelidores**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica)-Faculdade de Engenharia de Bauru da UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2009.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIČ, O. Pectin enzymes. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 33, p. 323-385, 1976.

RICHARDS, J. W. Studies of aeration and agitation. In: HOCKENHULL, D.J.D. *Progress in industrial microbiology*. vol 3, p. 143-172, 1961.

RITTER, C.E.T. **Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em processo submerso utilizando biorreatores com agitação mecânica e airlift de circulação interna**. 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

RITTER, C. E. T.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in na airlift bioreactor. **Bioresource Technology**. v. 148, p. 86-90, 2013.

ROCHA-VALADEZ, J.A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. **Bioprocess Engineering**. v. 23, p. 403-410, 2000.

RODRÍGUEZ PORCEL, E.M.; CASAS LÓPEZ, J.L.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M.; CHISTI, Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 26, p. 139-144, 2005.

SANDRI, I.G.; FONTANA, R.C.; BARFKNECHT, D.M.; SILVEIRA, M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **Food Science and Technology**. v. 44, p. 2217-2222, 2011.

SARDEING, R.; AUBIN, J.; XUEREBA, C. Gas-liquid mass transfer: a comparison of down-

and up-pumping axial flow impellers with radial impellers. **Chemical Engineering Research and Design**. Londres, v. 82, p. 1589-1596, 2004.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2. cap. 14. p. 277-332.

SCHUMPE A., QUICKER, G. Gas solubilities in microbial culture media. In: *Advanced Biochemical Engineering*. Berlin: Springer-Verlag, Ghose TK, Fiechter A and Blakebrough N. v. 24. p 1-37, 1982.

STEPHENIE, W.; KABEIR, B.M.; SHUHAIMI, M.; ROSFARIZAN, M. YAZID, A.M. Influence of pH and impeller tip speed on the cultivation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in a milk-based medium. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 12, p. 475-483, 2007.

TINOCO-VALENCIA, R.; GÓMEZ-CRUZ, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**. v. 177, p. 67-73, 2014.

VENNEKER, B.C.H.; DERKSEN, J.J.; VAN DEN AKKER, H.E.A. Population balance modeling of aerated stirred vessels based on CFD. **American Institute of Chemical Engineers Journal**. v. 48, p. 673-685, 2002.

XINHONG, L.; YUYUN, B.; ZHIPENG, L.; ZHENGMING, G.; SMITH, J. M. Particle image velocimetry study of turbulence characteristics in a vessel agitated by a dual *Rushton* impeller. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. Amsterdã, v. 16, p. 700-708, 2008.

YEN, H.; LIU, Y.X. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. p. 1-4, 2014.

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

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. α -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 5, p.115-121, 2000.

WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentation and enzyme technology**. New York: Wiley-Interscience. 182 p. (Techniques in pure and applied microbiology), 1979.

WUCHERPFENNIG, T.; KIEP, K.A.; DRIOUCH, H.; WITTMANN, C.; KRULL, R. Capítulo 4 - Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. **Advances in Applied Microbiology**. v. 72, p. 89-136, 2010.

ZAPATA, A.D.Z.; MONTOYA, C.A.G.; CAVALITTO, S.F.; HOURS, R.A.; ROJANO, B.A. Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (*Citrus aurantium* L.) with

protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products. **Food Science and Technology**. v. 45, p. 289-294, 2012.

ZIMMERMAN, W.B.; HEWAKANDAMBY, B.N.; TESAR, V.; BANDULASENA, H.C.H.; OMOTOWA, O.A. On the design and simulation of an airlift loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscillation. **Food and Bioprocess Processing**. v. 87, p. 215-227, 2009.

ZOU, M.; LI, X.; SHI, W.; GUO, F.; ZHAO, J.; QU, Y. Improved production of alkaline polygalacturonate lyase by homologous overexpression *pelA* in *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 1143-1150, 2013.