

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

**MARIANE MOLINA BUFFO**

**Transferência de oxigênio e cisalhamento em biorreator convencional com  
diferentes combinações de impelidores**

**São Carlos/SP  
2016**

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

**TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO E CISALHAMENTO EM BIORREATOR  
CONVENCIONAL COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE IMPELIDORES**

**Mariane Molina Buffo**  
Aluna de pós-graduação

**Alberto Colli Badino Júnior**  
Orientador - PPG-EQ/UFSCar

**Cristiane Sanchez Farinas**  
Co-orientadora - EMBRAPA Instrumentação, PPG-EQ/UFSCar

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração em **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos**.

São Carlos/SP  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B929t Buffo, Mariane Molina  
Transferência de oxigênio e cisalhamento em  
biorreator convencional com diferentes combinações de  
impelidores / Mariane Molina Buffo. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
84 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

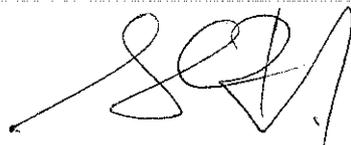
1. Associações de impelidores. 2. Impelidor orelha  
de elefante. 3. Turbina Rushton. 4. Transferência de  
oxigênio. 5. Consumo de potência. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARIANE MOLINA BUFFO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2016.

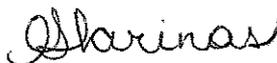
---

BANCA EXAMINADORA:

---



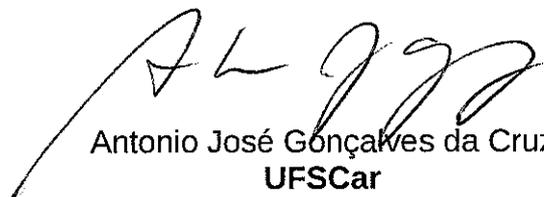
Alberto Colli Badino Junior  
**Orientador, UFSCar**



Cristiane Sanchez Farinas  
**Coorientadora, EMBRAPA**



Marcel Otavio Cerri  
**UNESP**



Antonio José Gonçalves da Cruz  
**UFSCar**

*“Dedico o presente trabalho aos meus pais, Evaldo e Ana Luiza”*

*“ Eu que já não sou assim  
muito de ganhar,  
junto às mãos ao meu redor.  
Faço o melhor que sou capaz  
só pra viver em paz.”*

*Los Hermanos*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e minhas irmãs por serem minha base em todos os momentos difíceis;

Aos meus familiares;

Aos meus amigos que de perto ou de longe sempre me apoiam e me ajudam, em especial a Josi pelo companheirismo de todos os dias;

Aos meus orientadores Prof. Alberto Colli Badino Júnior e Prof<sup>ª</sup>. Cristiane Sanchez Farinas pela orientação, ensinamentos e atenção ao longo de todo o período da minha formação;

Aos professores Marcel Otavio Cerri e Antônio José Gonçalves da Cruz por aceitarem fazer parte da qualificação e defesa, dando bons conselhos e sugestões;

Aos técnicos de laboratório do DEQ e da EMBRAPA pela ajuda ao longo do projeto;

Aos colegas de laboratório pela ajuda e apoio, em especial ao Mateus, Fernanda e Luciano que se disponibilizaram em ajudar em algumas etapas do trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado;

Ao PPG-EQ e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro;

À Embrapa Instrumentação pelo apoio institucional e infraestrutura ao projeto;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O crescimento celular e a morfologia de microrganismos filamentosos, bem como o produto de interesse são afetados pelo modelo de biorreator e pelas condições de operação adotadas durante a etapa de produção. O processo mais adotado industrialmente para produção de bioprodutos ainda são os cultivos submersos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, sendo o impelidor tipo turbina de seis pás planas ou turbina de Rushton (RT) o mais utilizado por promover boa mistura e adequada transferência de oxigênio, porém seu consumo de potência é alto além de impor alto cisalhamento ao caldo gerando um ambiente hostil ao microrganismo. Alternativamente, o impelidor tipo “orelha de Elefante” ou “Elephant ear” (EE) é apresentado na literatura como um impelidor de “baixo cisalhamento” mais adequado para o cultivo dos microrganismos sensíveis ao cisalhamento. Esse impelidor promove um escoamento misto (axial e radial) do caldo com escoamento para baixo (EEDP) ou para cima (EEUP) dependendo da sua geometria. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as melhores associações de impelidores para cultivos de fungos filamentosos em biorreator convencional. Primeiramente sete diferentes associações foram avaliadas em relação ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e consumo de energia. Os resultados obtidos utilizando a metodologia de planejamento experimental fatorial mostraram que as configurações EEDP-EEUP, RT-EEDP e EEDP-RT foram as que apresentaram melhores resultados em relação à transferência de oxigênio e consumo de potência, com eficiência até 87% superior à associação padrão RT-RT. Foram então selecionadas duas das associações de melhor desempenho e a tradicional (RT-RT) para serem avaliadas em relação ao cisalhamento, através de equações empíricas e em relação ao tamanho dos turbilhões, avaliado pela microescala de Kolmogorov. A associação que apresentou maiores valores para microescala de Kolmogorov e menor cisalhamento foi a EEDP-EEUP, com cisalhamento até 60% inferior que a observada quando utilizada a associação RT-RT. Na última etapa verificou-se os efeitos do cisalhamento na morfologia do fungo *Aspergillus niger*. Foram realizados cultivos de curta duração (4 h) para evitar que o crescimento celular prejudicasse a análise. Os resultados mostraram que no cultivo utilizando o sistema EEDP-EEUP predominou a forma morfológica de aglomerados celulares (*clumps*), enquanto que no cultivo com impelidores Rushton (RT-RT) predominou a forma morfológica de hifas ramificadas, sugerindo um cisalhamento mais intenso provocado por este sistema de agitação, que pode acarretar danos irreversíveis às células fúngicas.

Palavras-chave: Associações de impelidores, Impelidor orelha de elefante, Turbina Rushton, Transferência de oxigênio, Consumo de potência, Cisalhamento, *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

The type and operational conditions of a bioreactor chosen during the production phase of a product of interest affect not only the morphology and growth of filamentous microorganisms but also the product itself. Still the most common process to produce bioproducts is submerged cultures in conventional stirred and aerated bioreactors, with impeller of type six flat-blade turbine, or Rushton turbine (RT), which promotes good mixing and suitable oxygen transfer, but its power consumption is high and it causes high shear rate to the broth creating a hostile environment to the microorganisms. Alternatively, an impeller of the type “Elephant Ear” (EE) is shown in the literature as a “low shear” impeller, more suitable for the cultivation of shear sensitive microorganisms. This impeller creates a mixed flow (axial and radial) of broth with down flow (EEDP) or up (EEUP) depending on its geometry. This study aimed to evaluate the best association of impellers for filamentous fungi cultures in a conventional bioreactor. Initially the volumetric coefficient of oxygen transfer ( $k_{L,a}$ ) and the power consumption of seven different association of impellers were evaluated. The results obtained the factorial design methodology showed that the associations EEDP-EEUP, RT-EEDP, and EEDP-RT, showed the best results regarding the oxygen transfer and the power consumption, being up to 87% more efficient than the standard RT-RT association. Two of the better performing association and the traditional (RT-RT) were selected to be evaluated regarding the shearing, by using empirical equations and the size of the eddies, evaluated by the Kolmogorov microscale. The association that showed higher values on the Kolmogorov scale and least shearing was EEDP-EEUP, with shearing up to 60% lower than the RT-RT association. In the last step the effects of shear on the morphology of the fungi *Aspergillus niger* was evaluated. Short-term cultures (4h) were cultivated so that the cellular growth would not harm the analysis. The results showed that on the culture that used the EEDP-EEUP association the morphological form of cell clumps predominated, while on the culture that used the RT-RT association the morphological form of branched hyphae predominated, suggesting that the RT-RT association causes more shearing and can cause irreversible damage to the fungal cells.

Keywords: impellers associations, elephant ear impeller, Rushton turbine, oxygen transfer, power consumption, Shear, *Aspergillus niger*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 3.1</b> - Esquema da via secretora em hifas de fungos filamentosos.....	18
<b>Figura 3.2</b> - Imagem mostrando as diferentes classes morfológicas do fungo filamentoso <i>A. niger</i> : (a) <i>pellet</i> (b) <i>clump</i> (c) hifas ramificadas (d) hifas isoladas (não ramificadas). Aumento de 40x. ....	19
<b>Figura 3.3</b> - Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado e seus principais componentes. ....	23
<b>Figura 3.4</b> - Escoamento radial (a) e axial (b) provocado por diferentes impelidores. ....	27
<b>Figura 3.5</b> - Principais impelidores utilizados em bioprocessos. ....	29
<b>Figura 3.6</b> - Diagrama do número de potência ( $N_p$ ) em função do número de Reynolds modificado ( $Re$ ) para diferentes impelidores. ....	32
<b>Figura 3.7</b> - Tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da velocidade de cisalhamento ( $\gamma$ ) para fluídos Newtonianos e não-Newtonianos. ....	37
<b>Figura 3.8</b> - Ilustração da influência do tamanho do turbilhão no cisalhamento das células. A: Turbilhões maiores que as células “carregam” as células e causam menor cisalhamento. B: Turbilhões menores que as células interagem mais com essas e geram maior cisalhamento. .	40
<b>Figura 4.1</b> - Imagem e principais dimensões biorreatores utilizados (a) Ensaios de consumo de potência (b) Ensaios $k_{LA}$ e cultivos.....	42
<b>Figura 4.2</b> - Foto e esquema dos impelidores. (a) Orelha de elefante (EE) (b) Rushton (TR). ....	43
<b>Figura 4.3</b> - Esquema das associações de impelidores avaliadas. ....	44
<b>Figura 4.4</b> - Resumo das principais etapas necessárias para realização de cultivo submerso em reator.....	52
<b>Figura 5.1</b> - Comparação entre o desempenho das sete diferentes associações de impelidores em termos do consumo de potência ( $P$ ) em função das variáveis agitação e aeração. ....	54
<b>Figura 5.2</b> - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) para as diferentes associações de impelidores nas diferentes condições de aeração e agitação do planejamento experimental. ....	57
<b>Figura 5.3</b> - Eficiência de transferência de massa ( $E_{TM}$ ) para as diferentes associações de impelidores nos 5 pontos do planejamento experimental.....	59
<b>Figura 5.4</b> - Comparação entre valores calculados e experimentais de $k_{LA}$ para fluídos: (a) Newtonianos e (b) não-Newtonianos. Legenda: RT-RT (círculo/preto), EEDP-EEUP (quadrado/azul) e RT-EEDP (triângulo/vermelho). ....	62
<b>Figura 5.5</b> - Taxa de cisalhamento em função das condições operacionais ( $N$ e $\phi$ ) para as três associações de impelidores RT-RT (a), EEDP-EEUP (b), e RT-EEDP (c) e para 3 soluções de goma xantana: 1,5% (vermelho/círculo), 2,5% (preto/triângulo) e 3,5% (azul/quadrado) nas aerações de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 (cheio).....	64
<b>Figura 5.6</b> - Velocidade de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ) em solução de goma xantana 2,5% m/v em função das condições operacionais ( $N$ e $\phi$ ) para as três associações de impelidores: RT-RT (círculo/preto), EEDP-EEUP: (triângulo/azul), RT-EEDP (quadrado/vermelho), nas vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 vvm (cheio). ....	65

- Figura 5.7** - Escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições operacionais (N e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores, (a) RT-RT, (b) EEDP-EEUP, e (c) RT-EEDP, utilizando três soluções de goma xantana: 1,5% m/v (vermelho/círculo), 2,5% m/v (preto/triângulo) e 3,5% m/v (azul/quadrado) em vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 vvm (cheio)..... 68
- Figura 5.8** - Escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições operacionais (N e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores (RT-RT: preto/círculo, EEDP-EEUP: azul/triângulo, RT-EEDP: vermelho/quadrado) e solução de goma xantana 2,5% m/v nas vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 (cheio)..... 69
- Figura 5.9** - Esquema do escoamento gerado pela associação dos impelidores EEDP (em cima) e EEUP (embaixo). As setas pretas indicam as direções dos vórtices gerados pelos impelidores, os círculos azuis indicam as regiões de maior turbulência..... 71
- Figura 5.10** - Porcentagem das estruturas morfológicas ao longo do tempo de cultivo: (a) Associação RT-RT (b) Associação EEDP-EEUP (c) Associação RT-EEDP..... 73
- Figura 5.11** - Hipotética rota das formas morfológicas do microrganismo *A.niger* em cultivo de curta duração..... 74
- Figura 5.12** - Imagem dos inóculos utilizados nos cultivos de *A. niger* com as três diferentes associações de impelidores (RT-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP)..... 76
- Figura 5.13** - Imagens microscópicas de *A. niger* durante os cultivos com aumento de 40x.. 76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> - Viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) e parâmetros reológicos (K e n) dos fluidos Newtonianos e não-Newtonianos a 32°C. ....	41
<b>Tabela 4.2</b> - Parâmetros geométricos dos impelidores. ....	43
<b>Tabela 4.3</b> - Composição do meio de cultura. ....	46
<b>Tabela 4.4</b> - Metodologia do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> detalhando as variáveis de entrada (Agitação e Aeração) de cada ensaio realizado. ....	47
<b>Tabela 5.1</b> - Resultados do consumo de potência, número de potência e relação ( $P_g/P_0$ ) para os sistemas sem aeração e aerado de todas associações testadas. ....	53
<b>Tabela 5.2</b> - Análise dos efeitos das variáveis independentes frequência de rotação (N) e vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) na variável dependente consumo de potência, para fluido não-newtoniano (goma xantana 2,5% m/v). ....	55
<b>Tabela 5.3</b> - Valores obtidos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) das associações de impelidores testadas com fluido não newtoniano (goma xantana 2,5% m/v) no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> . ....	56
<b>Tabela 5.4</b> - Análise dos efeitos das variáveis independentes frequência de rotação (N) e vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) na variável dependente $k_{La}$ . ....	58
<b>Tabela 5.5</b> - Comparação das associações de impelidores quanto a transferência de oxigênio (valores de $k_{La}$ médio e variação), consumo de potência (valores de potência em média e variação) e eficiência (parâmetro que leva em consideração a quantidade de oxigênio transferido por unidade de potência). ....	60
<b>Tabela 5.6</b> - Resumo das características de transferência de massa e hidrodinâmicas das associações de impelidores (RT-RT; EEDP-EEUP e RT-EEDP) para frequências de rotação na faixa de de 600 a 1000 rpm e vazão específica de ar de 0,4 a 1,2 vvm para as soluções de goma xantana XGS1 a XGS3. ....	70
<b>Tabela 5.7</b> - Informações de oxigênio dissolvido, pH e reologia do caldo ao longo do cultivo. ....	72

## NOMENCLATURA

Ce: Concentração oxigênio dissolvido ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

Ce<sub>0</sub>: Concentração oxigênio dissolvido em  $t = t_0$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

Ce<sub>s</sub>: Concentração de saturação do oxigênio dissolvido com ar ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

RT: Impelidor Rushton

EE: Impelidor orelha de elefante

EEUP: Impelidor orelha de elefante de escoamento ascendente

EEDP: Impelidor orelha de elefante de escoamento descendente

SG: Solução de glicerol

XGS: Solução de goma xantana

HR: Hifas ramificadas

HI: Hifas isoladas

br: Comprimento braço/distância entre o motor e o dinamômetro (m)

E<sub>TM</sub>: Eficiência de transferência de massa ( $1.J^{-1}$ )

F: Força (N)

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

k<sub>e</sub>: Sensitividade do eletrodo ( $\text{s}^{-1}$ )

k<sub>LA</sub>: coeficiente de transferência de oxigênio ( $\text{s}^{-1}$ )

N: Frequência de rotação (rpm)

n: Índice de comportamento de escoamento (-)

P: Potência consumida (W)

T: Torque (N.m)

V: Volume de trabalho ( $\text{m}^3$ )

*Letras gregas*

$\phi$ : Vazão específica de alimentação de ar (vvm)

$\dot{\gamma}$ : velocidade cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ )

$\dot{\gamma}_m$ : velocidade cisalhamento média ( $\text{s}^{-1}$ )

$\varepsilon$ : Taxa de dissipação de energia ( $\text{W.kg}^{-1}$ )

$\lambda$ : Escala de Kolmogorov ( $\mu\text{m}$ )

$\mu$ : Viscosidade dinâmica ( $\text{Pa.s}$ )

$\mu_{ap}$ : Viscosidade aparente ( $\text{Pa.s}$ )

$\nu$ : Viscosidade cinemática ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ )

$\rho$ : massa específica ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

$\tau$ : tensão cisalhamento (Pa)

$\tau_e$ : tempo de resposta (s)

$\omega$ : Velocidade angular ( $\text{rad.s}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Fungos filamentosos</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 <i>Fisiologia, crescimento e secreção</i> .....	17
3.1.2 <i>Morfologia e condições de cultivo</i> .....	19
<b>3.2 Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 <i>Impelidores</i> .....	26
<b>3.3 Avaliação do desempenho de biorreatores</b> .....	<b>31</b>
3.3.1 <i>Consumo de potência</i> .....	31
3.3.2 <i>Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (<math>k_{LA}</math>)</i> .....	34
3.3.3 <i>Velocidade de cisalhamento média</i> .....	36
3.3.4 <i>Escala de Kolmogorov</i> .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>41</b>
4.1.1 <i>Fluídos</i> .....	41
4.1.2 <i>Biorreatores</i> .....	41
4.1.3 <i>Impelidores</i> .....	42
4.1.4 <i>Acessórios de controle e monitoramento</i> .....	44
4.1.5 <i>Equipamento para medida de potência</i> .....	45
4.1.6 <i>Reômetro</i> .....	45
4.1.7 <i>Meio de cultura e condições de cultivo</i> .....	45
4.1.8 <i>Microrganismo</i> .....	46
4.1.9 <i>Equipamentos para o cultivo do microrganismo</i> .....	46
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>47</b>
4.2.1 <i>Planejamento experimental</i> .....	47
4.2.2 <i>Medidas de consumo de potência</i> .....	48
4.2.3 <i>Medida do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (<math>k_{LA}</math>)</i> .....	48
4.2.4 <i>Eficiência de transferência de massa</i> .....	48
4.2.5 <i>Correlação para a velocidade de cisalhamento média</i> .....	49
4.2.6 <i>Escala de Kolmogorov</i> .....	51
4.2.7 <i>Metodologia experimental dos cultivos</i> .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
5.1 <i>Consumo de potência</i> .....	<b>53</b>
5.2 <i>Transferência de oxigênio</i> .....	<b>56</b>

5.3 Escolha das melhores associações de impelidores.....	58
5.4 Correlações para previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\gamma m$ ) .....	61
5.5 Microescala de Kolmogorov.....	67
5.6 Avaliação do cisalhamento “ <i>in vivo</i> ” em cultivos de <i>A. niger</i> .....	72
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7 SUGESTÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cultivos de microrganismos filamentosos aeróbios em tanques agitados e aerados têm se mostrado de grande importância em diversos setores industriais, produzindo importantes produtos comerciais como enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns compostos aromáticos (PAPAGIANNI, 2004; ROCHA-VALADEZ et al., 2007).

É importante em tais cultivos obter-se condições ótimas de operação (principalmente temperatura e pH), o que acarreta em maior produção e produtividade de produtos desejados. Tais condições ótimas passam também por uma boa transferência de oxigênio, que permite que o microrganismo cresça sem limitações metabólicas; baixo consumo de potência, o que torna o processo economicamente viável e adequado cisalhamento, permitindo o crescimento celular sem danos físicos às células.

Tais condições citadas, principalmente o cisalhamento, afetam a morfologia do microrganismo filamentosos e a produção do produto de interesse (AHAMED e VERMETTE, 2009; DRIOUCH et al., 2010). O fungo *Aspergillus niger*, por exemplo, tem a secreção de metabólitos intimamente ligada à sua morfologia (Krull, et al., 2010). Em cultivos onde o microrganismo cresce na forma de *pellets* ocorre maior produção de ácido cítrico, enquanto que em cultura dispersa e filamentosas quantidades mais elevadas de enzimas são observadas (DOMINGUES et al., 2000; ROBSON et al., 2008).

A relação entre a morfologia dos microrganismos e a formação de produtos é, portanto, de grande importância e complexa de ser investigada, já que muitos fatores estão inter-relacionados em um sistema de fermentação. A agitação de caldos de cultivo é um dos fatores determinantes no processo de fragmentação celular. Quando as hifas excedem um determinado comprimento, tal fragmentação é essencial para a manutenção do crescimento filamentosos disperso, porém deve ser tratada com cautela para não trazer danos irreversíveis às células (ROBSON et al., 2008).

Nesse sentido, geometrias alternativas de biorreatores vêm sendo sugeridas na literatura com o intuito de modificar o sistema de agitação de forma a se conduzir cultivos de microrganismos filamentosos com menores danos às células e, portanto, mais eficientes (AHAMED e VERMETTE, 2010; MICHELIN et al., 2013; LAN et al., 2013; PATEL et al., 2009). Relacionado ao tema, um pequeno número de estudos está focado no design dos impelidores, analisando seus desempenhos com base na quantificação de parâmetros como velocidade de cisalhamento média, energia cinética turbulenta, tamanho de turbilhão (microescala de Kolmogorov), dentre outros (SIMMONS et al., 2007; COLLIGNON et al.,

2010; BUSTAMANTE et al., 2013-2014; TANG et al., 2015). Um número ainda menor de estudos aborda as associações de impelidores como alternativa para o aumento de produtividade ou diminuição da desativação enzimática em cultivos (BAKRI et al., 2002; GHADGE et al., 2005).

Nos biorreatores convencionais o sistema de agitação é composto por impelidores, que são peças fundamentais para o adequado andamento do processo. A geometria e o tipo de impelidor influenciam na hidrodinâmica do biorreator, sendo a seleção de um impelidor ou associação de impelidores uma etapa fundamental para o sucesso do processo (GHOTLI et al., 2013). O impelidor mais tradicionalmente utilizado em biorreatores convencionais é o tipo turbina de seis pás planas ou turbina de Rushton (RT). Este determina uma adequada transferência de oxigênio ao processo, mas por outro lado apresenta desvantagens como altos cisalhamento e consumo de potência (BADINO et al., 2001; PATEL et al., 2009).

Atualmente impelidores de escoamento axial ou misto (axial/radial) vêm sendo estudados, pois criam um escoamento eficaz no interior do reator e geram valores de velocidade de cisalhamento menores do que impelidores de escoamento puramente radial (COLLIGNON et al., 2010). Dentre esses, um tipo de impelidor conhecido como "orelha de elefante" (*Elephant ear*: EE) vem sendo utilizado em cultivos que geram caldos viscosos envolvendo organismos sensíveis ao cisalhamento (MIRRO e VOLL, 2009). Devido à característica de escoamento axial, os EEs podem proporcionar um escoamento ascendente (EEUP) ou descendente (EEDP) (MIRRO e VOLL, 2009). Apesar do potencial dos impelidores EE para uso em cultivos de microrganismos, existem poucos estudos que comprovam essa eficiência e aparentemente nenhum estudo que trate da associação desses impelidores com outros de diferentes geometrias para tal aplicação.

A maioria dos estudos que buscam otimizar processos envolvendo cultivo de microrganismos focam seus esforços em variáveis operacionais (CUNHA et al., 2015; LI et al., 2013), formas de cultivo (CUNHA et al., 2012) ou no tipo de microrganismo utilizado (SAINI et al., 2015; HU et al., 2016). O presente trabalho procura mostrar a importância da influência dos impelidores nas variáveis hidrodinâmicas do biorreator e na morfologia do microrganismo o que pode levar a otimização de um determinado processo bioquímico.

Em face do apresentado, observa-se um compromisso entre as condições ideais de cultivo, que definem adequada mistura e transferência de oxigênio e o impacto do cisalhamento sobre o crescimento e morfologia de microrganismos filamentosos. Esses fatores devem ser avaliados de forma a otimizar a produção de um determinado bioproduto.

## 2 OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo avaliar diferentes associações de impelidores, formadas pelos impelidores Rushton (RT) e orelha de elefante de escoamento descendente (EEDP) e ascendente (EEUP) em biorreator convencional.

As associações foram avaliadas quanto ao consumo de potência, transferência de oxigênio através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ), cisalhamento através de correlações empíricas para a velocidade de cisalhamento média e microescala de Kolmogorov, bem como através da modificação da morfologia do fungo exposto às diferentes associações de impelidores.

Para atingir o objetivo geral do trabalho, foram cumpridas as seguintes etapas:

- 1) Ensaios com fluídos simulando caldo de cultivo. Nesses ensaios sete associações diferentes de impelidores foram testadas, sendo avaliadas quanto a transferência de massa ( $k_{L,a}$ ), consumo de potência e eficiência de transferência de massa. A etapa teve como intuito selecionar apenas as melhores associações para a sequência dos estudos;
- 2) Desenvolvimento de correlações para a determinação da velocidade de cisalhamento média nos sistemas selecionados;
- 3) Análise da microescala de Kolmogorov para as associações selecionadas, de modo a se verificar os danos que o escoamento de cada associação pudesse vir a causar em células de *A. niger*;
- 4) Ensaios “*in vivo*” com as associações de impelidores selecionadas para avaliação qualitativa dos efeitos de cada associação na morfologia de *A. niger*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O texto que segue traz aspectos relevantes sobre o tema abordado nesta dissertação, desde uma contextualização de sua importância até uma revisão dos principais trabalhos desenvolvidos na área que trouxeram contribuições para o entendimento e desenvolvimento do trabalho.

#### 3.1 Fungos filamentosos

Os fungos são os principais degradadores de biomassa vegetal na natureza e como tal, têm um papel fundamental no ciclo global do carbono e ecologia em geral. Como fungos não podem absorver compostos poliméricos eles produzem enzimas extracelulares que degradam os polímeros em monossacarídeos e oligossacarídeos de cadeia curta que são transportados e metabolizados no interior das células (MÄKELÄ et al., 2014). A maioria destas enzimas são hidrolíticas e desempenham um importante papel na nutrição dos fungos, liberando carbono e nitrogênio das macromoléculas insolúveis de outros organismos (ENSHASY, 2007).

Tais características de absorção e nutrição e uma via secretora muito desenvolvida tornaram os fungos filamentosos microrganismos de grande importância, sendo explorados industrialmente durante décadas para a produção de uma gama de enzimas comercialmente importantes. Dentre os principais fungos produtores dos coquetéis enzimáticos estão os da classe *ascomycete* (*Trichoderma reesei* e várias espécies de *Aspergillus*), que demonstraram possuir boas características de fermentação e são considerados seguros de acordo com a Food and Drug Administration (FDA). São esses os fungos filamentosos usados pelas grandes empresas produtoras de enzimas, como a Novozymes, DSM e DuPont (MÄKELÄ, 2014).

##### 3.1.1 Fisiologia, crescimento e secreção

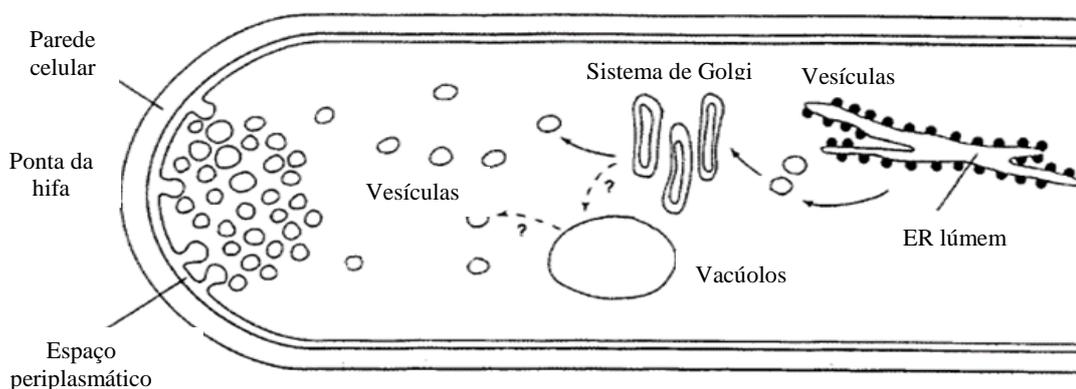
Fungos filamentosos têm células cilíndricas altamente alongadas (ou compartimentos) que são separados por septos de paredes perpendiculares. Os compartimentos são multinucleados e os fungos crescem por extensão de seus compartimentos apicais. À medida que o compartimento apical se prolonga, ele progride através de um ciclo mitótico ativo; isto é, a divisão dos seus núcleos é seguida por formação de septos do compartimento. Um

compartimento sub-apical também pode ramificar, resultando na formação de uma nova ponta estendida, permitindo ao ciclo mitótico ativo atuar novamente no compartimento. Células sub-apicais podem entrar em quiescência mitótica, onde elas assimilam o substrato e produzem materiais de parede celular e enzimas que são transportados para a ponta da hifa (AHAMED e VERMETTE, 2009). Dessa forma, os fungos filamentosos crescem por uma combinação de aumento e divisões celulares, não sendo um processo reprodutivo, já que não implica no aumento do tamanho da população (GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2010)

As hifas fúngicas crescem linearmente, formando um número crescente de pontas (extremidades) de crescimento, o que permite um crescimento exponencial dos fungos filamentosos. Novas pontas são formadas por ramificações, a formação de novos ramos permite aos fungos filamentosos aumentarem a superfície total de crescimento melhorando a absorção de nutrientes e secreção do produto.

A excreção de proteína por fungos filamentosos é em sua maioria restrita às pontas de crescimento das hifas, ou seja, parâmetros que aumentem o número de pontas ativas podem melhorar o rendimento da produção de proteína. O crescimento e a secreção de proteínas são processos polarizados, envolvendo o movimento de proteínas através de vesículas até às pontas de hifas crescentes onde a parede da célula é mais porosa do que em paredes mais velhas, o que permite uma mais rápida difusão das proteínas (ENSHASY, 2007). Uma hipotética via secretora nas hifas de fungos filamentosos é mostrada ilustrada na Figura 3.1.

**Figura 3.1** - Esquema da via secretora em hifas de fungos filamentosos.



Fonte: Adaptado Enshasy (2007).

### 3.1.2 Morfologia e condições de cultivo

Os fungos são organismos complexos morfologicamente, diferindo em sua estrutura em vários momentos do seu ciclo de vida. Um grande número de fatores contribui para o desenvolvimento de formas morfológicas específicas. Em geral, estes fatores podem ser divididos em três categorias principais:

- Fatores relacionados à linhagem, como por exemplo a espécie do fungo, tipo e concentração do inóculo, cinética de crescimento e fisiologia.
- Fatores relacionados à nutrição (meio de cultivo), como composição do substrato, adição de surfactantes, presença de partículas sólidas;
- Condições de cultivo, como as quantidades de oxigênio e dióxido de carbono dissolvidos, pH, temperatura, sistema de agitação, reologia, cisalhamento, tipos de biorreatores e formas de cultivo (PAPAGIANNI, 2004).

A morfologia dos fungos filamentosos pode ser classificada em três grupos principais: *pellets*, agregados miceliais (*clumps*) e micélio livremente dispersos (hifas ramificadas ou isoladas) (AHAMED e VERMETTE, 2009). A Figura 3.2 mostra uma imagem microscópica com essas principais formas morfológicas.

**Figura 3.2** - Imagem mostrando as diferentes classes morfológicas do fungo filamentososo *A. niger*: (a) *pellet* (b) *clump* (c) hifas ramificadas (d) hifas isoladas (não ramificadas). Aumento de 40x.



Fonte: Acervo Próprio.

Sabe-se que há uma relação entre a morfologia desses microrganismos e os fatores de processo anteriormente citados, porém muitas vezes é difícil relacionar exatamente cada variável a uma determinada morfologia, já que muitos parâmetros estão inter-relacionados em um meio de cultivo (PAPAGIANNI, 2004). Em muitos casos, uma particular forma morfológica obtém um desempenho de produção máximo, sendo de grande interesse para a otimização de processos. Vantagens e desvantagens do cultivo nas formas de micélio ou *pellet* deve ser balanceada (KRULL et al., 2010).

Quanto às vantagens e desvantagens processuais, a forma de cultivo em micélio facilmente provoca emaranhamento, o que cria uma indesejada alta na viscosidade do caldo de cultura. Assim, o comportamento reológico é geralmente não-newtoniano, conduzindo a viscosidades relativamente baixas em zonas com elevadas velocidades de cisalhamento (perto do impelidor) e muito altas viscosidades em regiões com baixo cisalhamento (perto da parede do reator). A elevada viscosidade e pseudoplasticidade da suspensão causa muitos problemas durante o cultivo como a diminuição das transferências de massa e de calor, limitando o fornecimento de nutrientes. Neste caso, apenas uma pequena região do biorreator, em torno do impelidor é mantida em condições adequadas de cultivo. O aumento da velocidade de agitação como tentativa de melhorar as condições adversas aumenta a homogeneidade global do cultivo, mas também aumenta o consumo de potência e o cisalhamento, o que danifica fisicamente as células podendo levá-las inclusive a autólise (KRULL et al., 2013).

Já o cultivo na forma de *pellets* tem a vantagem de diminuir a viscosidade do caldo de cultivo, o que pode tornar as propriedades reológicas mais newtonianas levando a melhores transferências de calor e massa. No entanto, uma limitada disponibilidade de nutrientes pode ocorrer no interior dos *biopellets*, diminuindo a área ativa do fungo. (ENSHASY, 2007; KRULL et al., 2013).

Além das vantagens e desvantagens processuais, em cada processo biotecnológico a morfologia ideal varia de acordo com o produto de interesse e não pode ser generalizada. Como exemplo, a formação de produtos por *A. niger* está intimamente ligada a sua morfologia (KRULL et al., 2010). *A. niger* é importante comercialmente como principal produtor de ácido cítrico e enzimas de valor mais elevado, como as pectinases, amiloglucosidases, proteases, celulases, hemicelulases e lipases. Enquanto alguns produtos, tais como o ácido cítrico são produzidos em níveis elevados em culturas peletizadas, a maioria das enzimas, incluindo as celulases, são produzidas em quantidades significativamente mais elevadas quando a cultura se encontra dispersa (ROBSON et al., 2008).

A fragmentação de elementos de hifas ocorre continuamente durante o

crescimento em culturas submersas em reatores agitados e é essencial para a manutenção do crescimento filamentosamente disperso, porque gera novos elementos de hifas de crescimento, funcionando semelhante à divisão celular em microrganismos unicelulares. Porém, tal fragmentação deve ser tratada com cautela para não trazer danos irreversíveis às células. A fragmentação resulta da interação entre o estado fisiológico do organismo e os efeitos físicos da tensão de cisalhamento (ROBSON et al., 2008).

Em estudo realizado por Ahamed e Vermette (2009), buscou-se determinar como diferentes meios de cultivo influenciavam na morfologia dos fungos e na produtividade volumétrica de celulase por *T. reesei*. Foram realizados cultivos de batelada alimentada em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado de 7 L, utilizando quatro meios de cultivos diferentes. Os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura com extrato de levedura e celulose e estão associados com as seguintes características morfológicas do fungo: o micélio apresentou 98% da área total média projetada, comprimento de hifas de 10 milímetros (volume médio das hifas de 45,1 mm<sup>3</sup>), diâmetro médio das hifas de 7,9 µm e número de ramos entre 9 e 29 pontas por hifa. O estudo buscou mostrar que é possível melhorar a produção de proteínas por meio do controle da morfologia do fungo.

Estudo realizado por Driouch et al. (2010) mostra como a suplementação com micropartículas de silicato é uma nova e promissora abordagem para controlar o desenvolvimento morfológico de *A. niger*. Com a variação cuidadosa do tamanho e concentração do micro material adicionado, um certo número de formas morfológicas distintas, incluindo *pellets* de tamanhos diferentes, micélio livre disperso e fragmentos de hifas curtas podem ser criados com reprodutibilidade. Com relação à formação de micélio livremente disperso em reatores agitados, a produção de proteínas foi até quatro vezes mais elevada. Além disso, o acúmulo indesejado de oxalato foi suprimida em até 90%. Para o crescimento em *pellets*, a produção de proteína foi máxima apenas dentro de uma camada fina na superfície do *pellet* e diminuiu drasticamente no interior do *pellet*. De forma geral, o estudo mostrou que o uso de micropartículas permite uma engenharia específica e bastante precisa de controle de morfologia celular e cria novas possibilidades de projeto e otimização de bioprocessos com *A. niger* e também outros fungos.

Lu et al. (2015a) verificaram o efeito da morfologia do inóculo de *A. niger* na produção de ácido glucônico (AG), produzido pela ação de enzimas sintetizadas pelo fungo. Três inóculos diferentes (*pellets* de maior tamanho, *pellets* de menor tamanho e micélio livremente disperso) foram produzidos em reator de 15 L variando-se as condições de agitação no reator. O aumento da produção de AG devido ao uso da morfologia dispersa foi de 73 e 39%

em relação às morfologias de *pellets* grandes e pequenos, respectivamente. Além disso, o valor do  $k_{LA}$  foi 13% superior na morfologia dispersa, o que pode ser um fator que contribuiu para o aumento da produção, mostrando que o controle da morfologia pode ser uma técnica importante para aumentar a produção de AG.

Devido à alta relevância industrial dos fungos filamentosos, nos últimos anos tem-se observado um desenvolvimento substancial de ferramentas e técnicas para caracterizar o seu crescimento e obter estimativas quantitativas de suas propriedades morfológicas (KRULL et al., 2013). Como exemplo, a análise de imagens combinadas com ensaios bioquímicos podem ser usadas para estudar as interações complexas entre morfologia, produtividade enzimática e condições do processo em fermentações submersas de microrganismos filamentosos (AHAMED e VERMETTE, 2009).

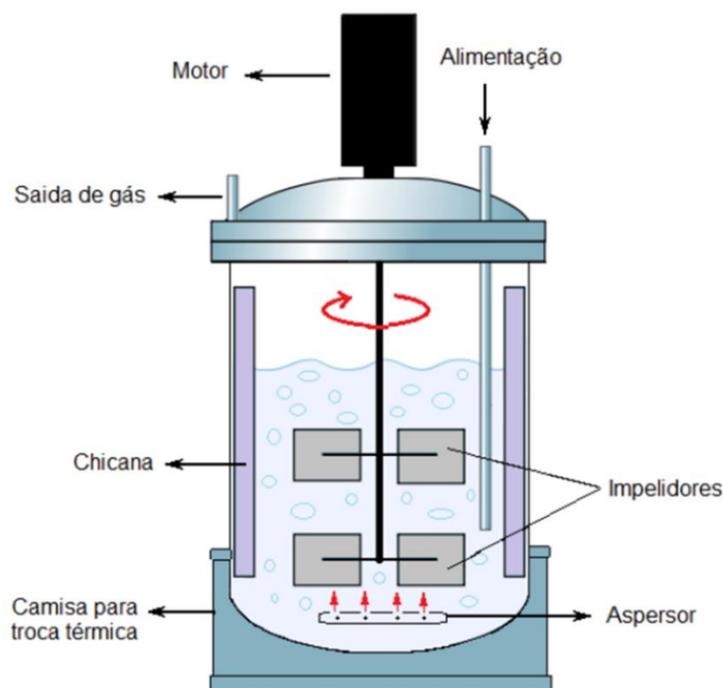
### **3.2 Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado**

Os biorreatores mais amplamente empregados em todas as escalas de produção são os biorreatores de mistura agitados mecanicamente (*stirred tank bioreactor* - STB), denominados biorreatores convencionais. O biorreator STB consiste num tanque cilíndrico, com relações geométricas (altura/diâmetro, diâmetro impelidor/diâmetro reator) definidas, podendo variar de acordo com as necessidades específicas de cada processo, como a necessidade de maior homogeneização do meio ou melhor transferência de massa (SCHMIDELL et al., 2001).

O biorreator normalmente também apresenta um sistema de hastes defletoras ou chicanas, cuja principal função é evitar a formação de vórtices e zonas estagnadas durante a agitação do caldo. A agitação é realizada através de um motor ligado a um eixo central e que possui ao longo de sua altura impelidores, que podem ser de diferentes geometrias. A aeração é realizada por um aspersor localizado na base do equipamento (SCHMIDELL et al., 2001).

A Figura 3.3 ilustra o esquema de um biorreator STB, com suas principais partes.

**Figura 3.3** - Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado e seus principais componentes.



Fonte: Bustamante (2013).

O uso de tanques agitados como fermentadores constituem projetos aparentemente simples e de custos reduzidos em relação a modelos mais recentes de biorreatores, isso devido aos vários estudos já realizados na área e ao conhecimento sobre cinéticas de crescimento e produção nestes sistemas. Um tanque agitado e aerado tem geralmente elevados coeficientes de transferência de massa e calor, boa capacidade de mistura líquido-gás e capacidade de operar com uma vasta gama de velocidades de agitação e aeração, sendo por isso amplamente utilizados em processos biotecnológicos.

A agitação e a aeração são de primordial importância em cultivos aeróbios, tal como é a produção de enzimas por fungos filamentosos. O aumento das condições de agitação e aeração podem trazer efeitos positivos e negativos em cultivos de fungos filamentosos em biorreatores convencionais. Os efeitos positivos são um maior fornecimento de oxigênio ao microrganismo durante o processo e uma melhoria na mistura do meio, o que acaba por melhorar a transferência de massa (oxigênio) e calor. Os efeitos negativos são um maior consumo de energia, problemas com a formação de espuma e uma maior tensão mecânica e cisalhamento sobre a biomassa fúngica, o que pode causar alterações morfológicas e variações no crescimento da biomassa e formação de produto, afetando o desempenho da cultura (LIN et al., 2010; GABELLE et al., 2012).

O oxigênio é um substrato chave para o crescimento celular, manutenção de vias

metabólicas e síntese de produtos por microrganismos aeróbios. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) no caldo depende da velocidade de transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida e da velocidade de consumo de oxigênio pela cultura de células. A velocidade de consumo de oxigênio é uma característica fisiológica das culturas de microrganismos e seu valor é consideravelmente alto, alterando-se durante o decurso do bioprocessamento caso haja mudança na população de células. Qualquer falta de oxigênio às células pode afetar o desempenho do processo (GOGATE et al., 2000).

A velocidade de transferência de oxigênio é limitada devido à baixa solubilidade do mesmo em soluções aquosas. Uma aeração eficiente depende da velocidade de transferência do oxigênio das bolhas de gás para o caldo, ou seja, da capacidade do biorreator para satisfazer a demanda de oxigênio da população microbiana que muitas vezes é um passo limitante dos bioprocessos. A velocidade de transferência de oxigênio dissolvido pode ser analisada e descrita por meio do coeficiente de transferência de massa ( $k_L a$ ), sendo um dos parâmetros mais importantes para o projeto e operação de biorreatores de mistura, além de desempenhar papel importante no aumento de escala de biorreatores (MICHELIN et al., 2013).

Outro fator que limita a transferência de oxigênio dificultando a obtenção de boa mistura das suspensões é a reologia do caldo. O crescimento de células miceliais e o aumento da concentração de biomassa impactam fortemente na viscosidade do caldo tornando-o altamente pseudoplástico (GABELLE et al., 2012). Em meios pseudoplásticos a velocidade de cisalhamento próxima ao impelidor é elevada, resultando em um fluido de baixa viscosidade aparente e, conseqüentemente, uma boa mistura e transferência de massa. No entanto, afastando-se do impelidor a velocidade de cisalhamento é significativamente menor, resultando em um líquido de alta viscosidade aparente, o que prejudica a mistura e a transferência de massa (GOGATE et al., 2000).

Esses gradientes de viscosidade que surgem nos caldos não newtonianos podem trazer prejuízos ao desempenho do processo. Uma maior dificuldade na distribuição do ar no líquido devido à sucção causada pelo impelidor, faz com que o ar de entrada flua na direção do impelidor devido à menor viscosidade do fluido naquele local. Além disso, pode ocorrer a formação de “cavernas” que são cavidades de gás que permanecem estáveis, envolvendo as lâminas dos impelidores, devido à elevada viscosidade fora da região do impelidor e a baixa velocidade de subida das bolhas (GOGATE et al., 2000).

O cisalhamento pode, contudo, trazer vantagens ao cultivo, como visto anteriormente, podendo diminuir a viscosidade do caldo. No entanto, é difícil conhecer e modular a distribuição de tensão de cisalhamento dentro de biorreatores, muitas vezes

resultando em níveis de tensão de cisalhamento que danificam microrganismos filamentosos e diminuem potencialmente a produção (PATEL, 2009).

Portanto, para conseguir condições ótimas de operação em bioprocessos é necessário um equilíbrio de vários fatores, tais como a homogeneidade do caldo de fermentação, transferência de massa, concentração de substrato, cisalhamento e facilidade de aumento de escala, com o objetivo de se obter máxima produção e produtividade de produtos desejados. Nesse sentido, muitos biorreatores e/ou geometrias alternativas vêm sendo sugeridos na literatura para a produção econômica e eficiente.

Biorreatores airlift foram estudados por Ahamed e Vermette (2010) e por Michelin et al. (2013) como forma de aumentar a velocidade de transferência de oxigênio e limitar os efeitos deletérios das tensões de cisalhamento sobre os microrganismos filamentosos, buscando minimizar o consumo de energia e aumentar a produção de celulases. Os melhores resultados ocorreram nas maiores velocidades de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ), mostrando esse ser o fator que mais afeta a formação do produto. Para um mesmo valor de  $k_{LA}$ , o reator airlif apresentou maior produtividade na produção de enzima do que o biorreator convencional, o que foi atribuído ao diferente design e menor cisalhamento do biorreator airlif.

Em estudos realizados por Lan et al. (2013) foram demonstradas as vantagens da imobilização do micélio em leito fibroso rotativo para a produção de celulases, vantagens atribuídas a uma operação mais simples deste reator e a um melhor controle do processo e da morfologia fúngica. O caldo produzido pela fermentação com células imobilizadas apresentou maior eficiência de sacarificação devido a atividade mais elevada de FPase, o que foi atribuído às melhores exoglucanases e celobiohidrolases produzidas pelo fungo *T. viride*.

Em estudos realizados por Patel et al. (2009) foram comparados dois biorreatores, um tanque agitado e aerado (STB) e um de placa em movimento (RPB), sendo eles caracterizados por significativas diferenças nas velocidades de cisalhamento proporcionadas aos microrganismos. Uma maior concentração de biomassa ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi obtida com condições de agitação mais elevadas em ambos os reatores, devido a um melhor suprimento de oxigênio. No entanto, as melhores atividades enzimáticas em papel de filtro foram obtidas com uma menor agitação em ambos os biorreatores, demonstrando claramente que a atividade da celulase foi reduzida com o aumento da frequência de agitação e, portanto, das condições de cisalhamento.

Revisão realizada por Gogate et al. (2000) mostra as vantagens do uso de sistemas com vários impelidores em comparação a um único impelidor na agitação de biorreatores. Um único impelidor leva a uma distribuição desigual de cisalhamento e potência.

Para uma potência equivalente sistemas de múltiplos impelidores levam a valores mais baixos de cisalhamento, devido à necessidade de menor frequência de agitação. Além disso, sistemas com múltiplos impelidores possuem uma distribuição eficiente do gás, maior tempo de retenção gasosa (*hold-up*), menor consumo de potência por impelidor e alto coeficiente de transferência de massa gás-líquido ( $k_{La}$ ). Os autores afirmam ainda que essas características podem ser maximizadas escolhendo-se adequadamente as combinações de impelidores e os parâmetros geométricos do biorreator.

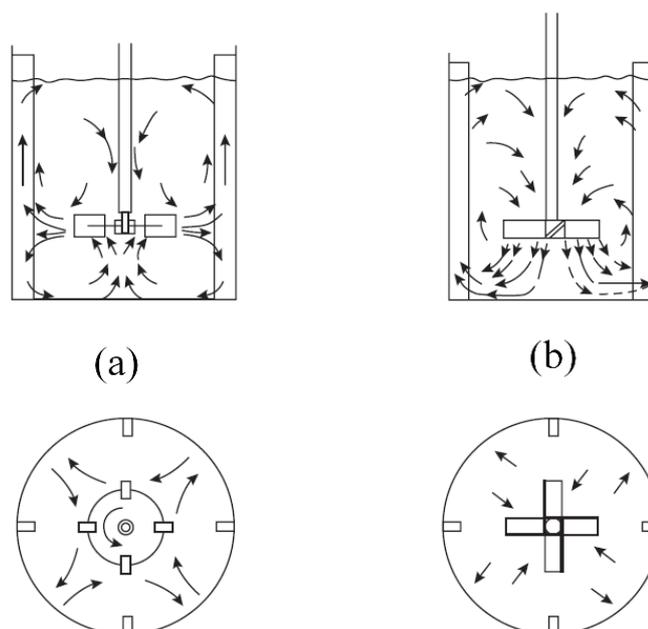
Os resultados dos estudos citados apontam para o compromisso entre o coeficiente de transferência de massa de oxigênio elevado ( $k_{La}$ ) e o impacto negativo do cisalhamento sobre o crescimento dos fungos. Além disso, mostram que a frequência de agitação e o tipo de dispositivos de mistura utilizado tem efeito significativo sobre a morfologia do fungo e o produto de interesse.

### 3.2.1 Impelidores

Em biorreatores convencionais os impelidores são peças fundamentais determinando o adequado andamento do processo. A geometria do impelidor influencia a hidrodinâmica do caldo de fermentação, o consumo de potência, a transferência de oxigênio, o cisalhamento e morfologia de células filamentosas e, portanto, a biossíntese do produto de interesse (TANG et al., 2015). Portanto, a seleção de um impelidor adequado para um processo requer informações precisas sobre as propriedades do fluido, condições do processo e peculiaridades do mesmo (GHOTLI et al., 2013).

Dependendo do tipo de impelidor, o escoamento pode ser radial, axial ou uma combinação de ambos. Como mostrado na Figura 3.4 (a), o escoamento radial ocorre quando o fluido é impelido radialmente do eixo do impelidor em direção à parede do vaso. O escoamento axial, Figura 3.4 (b), ocorre quando o fluido é impelido para cima ou para baixo ao longo do eixo do impelidor. A orientação do impelidor e o sentido de rotação do eixo (horário ou anti-horário) determinam se a direção do escoamento axial é para cima ou para baixo (MIRRO e VOLL, 2009).

**Figura 3.4** - escoamento radial (a) e axial (b) provocado por diferentes impelidores.



Fonte: Towler (2008).

O impelidor mais tradicionalmente utilizado em biorreatores convencionais é o tipo turbina de 6 pás planas ou turbina de Rushton (RT), assim chamado devido a seu inventor J.H. Rushton (RUSHTON et al. 1950). Embora determine uma adequada transferência de oxigênio ao processo, apresenta desvantagens como a geração de misturas não uniformes com elevado cisalhamento em regiões próximas às pás e bem mais ameno nas periferias do biorreator, além de alto consumo de potência (BADINO et al., 2001; PATEL et al., 2009). Esses impelidores são comumente usados em cultivos de microrganismos que não sejam considerados sensíveis ao cisalhamento, incluindo leveduras, bactérias e alguns fungos. Trata-se de um impelidor de 6 pás planas lisas que fixadas verticalmente num disco ao longo do eixo de agitação produz um escoamento radial e unidirecional (PATEL et al., 2009; MIRRO e VOLL, 2009).

Atualmente, impelidores de escoamento axial ou misto (axial/radial) vêm sendo estudados, pois criam um bombeamento eficaz no interior do reator e geram valores de velocidade de cisalhamento menores do que impelidores de escoamento radial (COLLIGNON et al., 2010). Recentemente, um tipo de impelidor conhecido como "orelha de elefante" (*Elephant ear*, EE) pelo formato e posicionamento de suas lâminas, tornou-se amplamente utilizado em bioprocessos, devido a características como "baixo cisalhamento" e adequada transferência de oxigênio, sendo utilizado em cultivos que geram caldos viscosos e envolvem

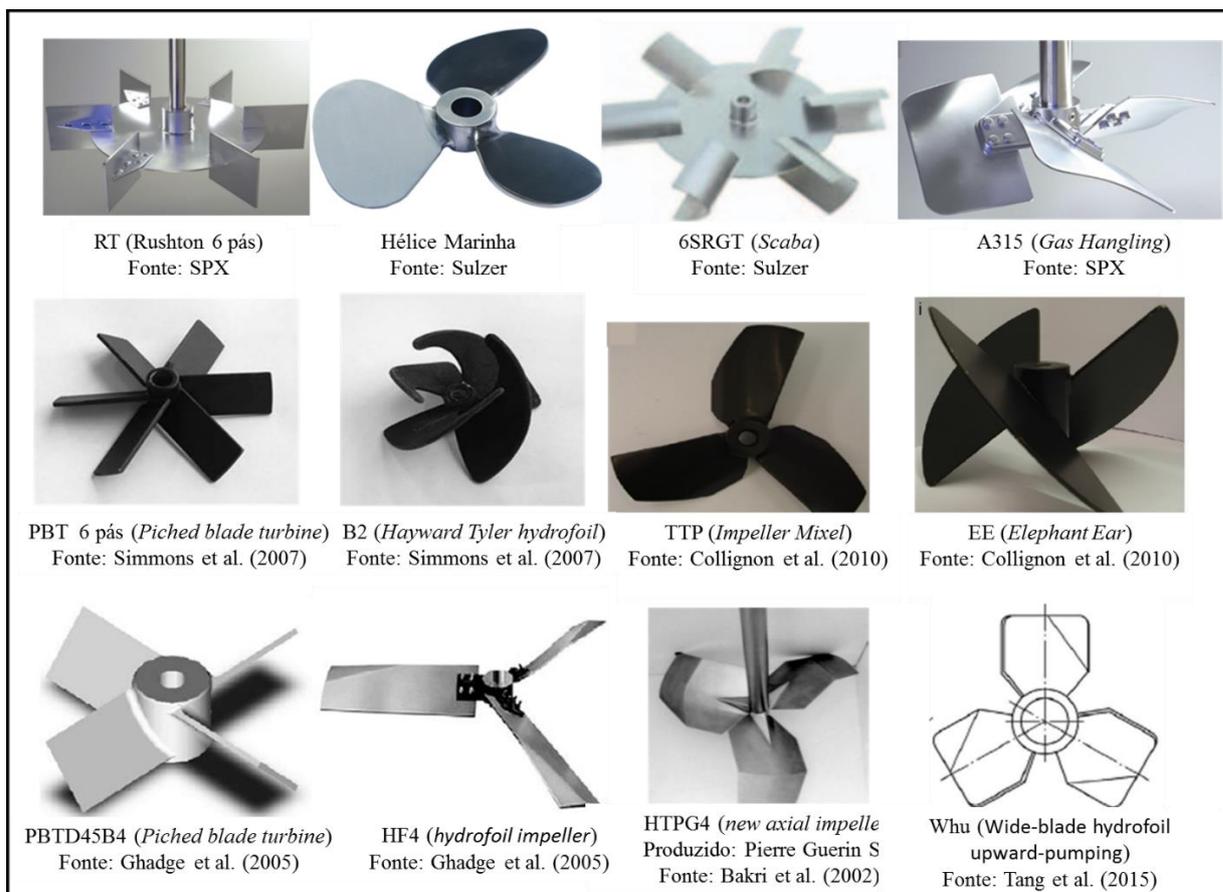
organismos sensíveis ao cisalhamento como células animais/vegetais, bactérias e fungos filamentosos (MIRRO e VOLL, 2009).

Os impelidores tipo EE apresentam 3 pás planas inclinadas e produzem um escoamento misto (axial e radial) ao fluido agitado, o que proporciona um escoamento diferenciado e uma melhor mistura global, gerando maiores velocidades de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) em comparação, por exemplo, às lâminas unidirecionais dos impelidores tipo hélice marinha (*marine-blade impeller*). Devido à característica de escoamento axial, os EEs podem proporcionar um escoamento ascendente (EEUP) ou descendente (EEDP) dependendo da orientação do impelidor e do sentido de rotação do eixo, horário ou anti-horário (MIRRO e VOLL, 2009).

Os EE são comercializados como impelidores de "pequeno corte", o que significa dizer que eles causam menos danos às células delicadas do que outros impelidores. Tal impelidor tem uma relação de elevada solidez (área das lâminas dividida pela área do círculo varrido pelas lâminas em rotação) e profundidade. Além disso, possuem um raio de curvatura constante, o que justificaria uma velocidade de cisalhamento mais baixa e uniforme ao longo de toda a borda da lâmina (SIMMONS et al., 2007).

A Figura 3.5 ilustra os principais impelidores usados na indústria dentre os que foram citados.

**Figura 3.5 - Principais impelidores utilizados em bioprocessos.**



Fonte: Acervo Próprio.

Fort (2011) estudou a eficiência hidráulica dos escoamentos de impelidores de pás inclinadas, constatando que essas aumentam significativamente com a diminuição do ângulo de inclinação, e também com a diminuição da razão entre diâmetros do impelidor e do vaso. O arranjo ideal recomendado pelo estudo para sistema de mistura foi o ângulo de inclinação de 45°, 4 pás e diâmetro do impelidor igual a 1/3 do diâmetro do vaso.

Ghotli et al. (2013) estudaram os efeitos dos ângulos de curvatura e tamanhos de disco centrais para 6 impelidores de lâminas curvas no consumo de potência em condições com aeração e sem aeração, comparando os resultados com o da turbina de Rushton. Os resultados mostraram que a redução do ângulo de curvatura causa um aumento do número de potência do impelidor e que, de modo geral, os impelidores de lâminas curvas tiveram menor consumo de potência, tanto na condição aerada como na não aerada, em comparação com a turbina de Rushton.

Sardeing et al. (2004) compararam os desempenhos de dois impelidores axiais (turbina de lâmina inclinada e A315) nas configurações de bombeamento para cima e para

baixo, com dois impelidores de escoamento radial (turbina Rushton e um Scaba 6SRGT). Os resultados mostraram que os impulsores de escoamento axial operados no modo de bombeamento para cima apresentaram um desempenho superior na dispersão de gás e na transferência de massa gás-líquido do que a configuração de bombeamento para baixo. Tal fato foi justificado, principalmente, pela diferença dos escoamentos gerados nos dois bombeamentos. A turbina Rushton apresentou uma capacidade elevada de retenção gasosa (*hold-up*) e  $k_{La}$ , mas exigiu alta energia, o que a torna economicamente ineficiente. De forma geral, o impelidor A315 obteve o melhor desempenho, com boa capacidade de movimentação de gás e eficiência de transferência de massa.

Simmons et al. (2007) compararam o desempenho do impelidor orelha de elefante no modo de bombeamento para cima (EEUP) com os de outros 2 impelidores (PBT e B2). A partir de estudos de padrão escoamento, tempo de mistura, consumo de potência e distribuição de energia cinética turbulenta, os autores não puderam constatar menor cisalhamento do EE em relação aos outros dois impelidores axiais.

Colognon et al. (2010) desenvolveram método para avaliar e selecionar os melhores de 7 impelidores axiais. Os impelidores foram testados na mínima rotação de suspensão de cada um e classificados em relação aos danos mecânicos, através da avaliação de macro-cisalhamento utilizando a técnica de velocimetria por imagem de partículas (PIV - *Particle Image Velocimetry*) e micro-cisalhamento (escala de Kolmogorov). Os impelidores TTP e orelha de elefante foram os que apresentaram os menores danos mecânicos.

Bustamante et al. (2013, 2014) compararam a velocidade de cisalhamento média dos impelidores Rushton, EEUP e EEDP. Correlações foram desenvolvidas no trabalho para estimar a velocidade de cisalhamento média em função das condições de operação (agitação e aeração) e das propriedades reológicas do fluido, usando o  $k_{La}$  como parâmetro característico. O impelidor EEUP foi o que apresentou resultados mais satisfatórios, combinando uma boa transferência de oxigênio com baixo cisalhamento.

Bakri et al. (2002) observaram a melhoria da produção de celulases pelo fungo *Penicillium canescens* 10-10c, através de modificações no sistema de impelidores com o intuito de reduzir o consumo de energia e tornar o cisalhamento mais uniforme, mas sem diminuir a capacidade de transporte de oxigênio. Para tal, um novo impelidor de fluxo axial foi testado, o HTPG4, sendo o melhor desempenho obtido na combinação de um impelidor tradicional de fluxo radial e o novo de fluxo axial, DT4-HTPG4, o que produziu 23% a mais de enzimas do que uma configuração de dois Rushton, DT4- DT4, em agitação de 600 rpm e aeração de 1 wm.

Ghadge et al. (2005) investigaram a desativação da celulase em reatores de tipo

tanque agitado com diferentes configurações de impelidores. Foi possível verificar pelo estudo uma redução da velocidade de cisalhamento com o aumento do diâmetro do tanque e diminuição do número de pás dos impelidores. Nos sistemas de dois impelidores, a maior desativação foi observada para a configuração com uma turbina de disco (DTD05T) e um impelidor de pá inclinada (PBTD45D05T), enquanto a configuração com um impelidor hidrodinâmico (HF4D056T) e o PBTD45D05T exibiu menor grau de desativação. Assim, verificou-se que a desativação da celulase foi drasticamente diferente para os diferentes tipos de impelidores.

Tang et al. (2015) analisaram as características de 3 impelidores Rushton (RT) e 3 impelidores axiais (Whu) em cultivos de *A. niger* para produção de amiloglucosidase. Os autores verificaram que o sistema com impelidores Whu gerou 40% mais *pellets* e quantidade maior de *pellets* ativos. Além disso, os *pellets* se mostraram mais soltos, em contraste a estrutura compacta dos *pellets* gerados no sistema com os impelidores RT. Tal fato evidenciou as diferentes morfologias dos *pellets* devido ao cisalhamento de cada impelidor. Ao final constatou-se uma atividade enzimática 25% mais elevada para o sistema com impelidores Whu e eficiência de transferência de massa 60% superior.

### 3.3 Avaliação do desempenho de biorreatores

Existem diversas formas de se avaliar o desempenho de um biorreator ou bioprocesso. Na presente dissertação a análise será feita principalmente de duas formas: através de análises “*in vivo*” do comportamento morfológico do microrganismo e através da análise de parâmetros essenciais ao bom funcionamento do biorreator denominados critérios de desempenho, como o consumo de potência, o coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e o cisalhamento sofrido pelas células.

#### 3.3.1 Consumo de potência

Nos biorreatores tanque agitado e aerado a energia é transmitida ao fluido principalmente pela agitação, por meio dos impelidores. Dessa forma o consumo de potência deve-se, quase na sua totalidade, à resistência que o caldo exerce sobre as pás dos impelidores quando esses são rotacionados (BADINO, 1997).

Uma maneira de se avaliar o consumo de potência é através de correlações disponíveis na literatura para sistemas gaseificados ( $P_g$ ) e não gaseificados ( $P_0$ ). Porém, essas

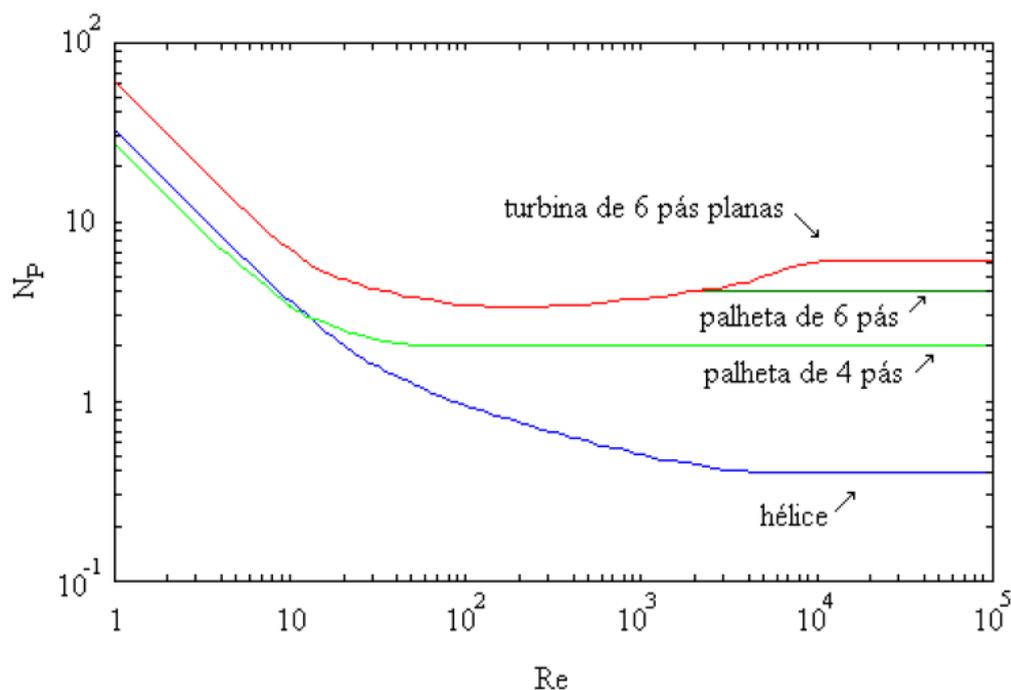
correlações são obtidas com fluídos diferentes dos caldos de fermentação e em geometrias específicas, o que as tornam limitadas para a previsão do consumo de potência em cultivos específicos.

Num dos trabalhos mais clássicos relacionados ao assunto, Rushton et al. (1950) desenvolveram o conceito de número de potência ( $N_P$ ) e número de Reynolds modificado ( $Re$ ) correlacionaram esses dois adimensionais para estimativa da potência para sistemas não gaseificados,. A Figura 3.6 ilustra o diagrama obtido.

$$Re = \frac{\rho N D_i^2}{\mu} \quad (3.1)$$

$$N_P = \frac{P_0}{\rho N^3 D_i^5} \quad (3.2)$$

**Figura 3.6** - Diagrama do número de potência ( $N_P$ ) em função do número de Reynolds modificado ( $Re$ ) para diferentes impelidores.



Fonte: Adaptado de Rushton et al. (1950).

A grande maioria dos tanques agitados trabalham em regime turbulento ( $Re > 10^4$ ) para favorecer as transferências de quantidade de movimento, calor e massa. Como observado no gráfico da Figura 3.6, o número de potência ( $N_P$ ) é constante em regime turbulento, para os quatro impelidores testados, o que significa que  $N_P$  não varia mais com

Reynolds, ou seja, com a viscosidade do fluido.

Os consumos de potência de sistemas aerados ( $P_g$ ) ou não aerados ( $P_0$ ) podem ser obtidos de forma experimental, como descrito no trabalho de Badino et al. (1994), sendo a potência ( $P$ ) calculada como produto do torque ( $T$ ) requerido para a agitação do fluido e a velocidade angular ( $\omega$ ).

$$P = T \cdot \omega \quad (3.3)$$

O torque requerido para a agitação pode ser calculado pelo produto entre a força ( $F$ ) e o comprimento do braço ( $br$ ) fixado ao motor do reator e apoiado em um rolamento, livre para movimentação angular.

$$T = F \cdot br \quad (3.4)$$

A velocidade angular do eixo do agitador é dada por:

$$\omega = 2\pi N \quad (3.5)$$

onde  $N$  é a frequência de rotação, parâmetro que quantifica a agitação.

Em estudo realizado por Zhu et al. (2009) foram analisadas duas configurações de impelidores orelha de elefante, o de escoamento ascendente (EEUP) e o de escoamento descendente (EEDP). As análises foram realizadas em relação aos perfis de velocidade, número de potência, energia cinética turbulenta e *hold-up*. Com relação ao número de potência, os autores concluíram que a aeração não afetava o EEUP, enquanto diminuía em até 30% a potência do EEDP. Na maior aeração utilizada (0,5 vvm) e em agitação de 600 rpm, o número de potência dos impelidores foram iguais 1,7 e 1,5 para os impelidores EEUP e EEDP, respectivamente.

Mais recentemente, estudo realizado por Bustamante (2013) comparando o consumo de potência dos impelidores Rushton e as duas configurações de orelha de elefante (EEUP e EEDP), utilizando o mesmo método experimental descrito nessa seção, constatou-se um maior  $N_P$  para a turbina Rushton ( $N_P \approx 7$ ), enquanto o impelidor EEUP apresentou  $N_P \approx 2,7$  e o EEDP  $N_P \approx 2,2$ , todos em regime turbulento de agitação.

### 3.3.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ )

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) é muitas vezes usado para comparar a eficiência de biorreatores e dispositivos de mistura. Além disso, é considerado como um importante fator de aumento de escala, já que em qualquer escala, deseja-se alcançar uma capacidade de transferência de oxigênio que seja capaz de atender à demanda de oxigênio da cultura. Muitas vezes a aeração e agitação são selecionadas para atingir o coeficiente de transferência de massa de oxigênio desejado, uma vez que este é o parâmetro de controle na maioria dos cultivos aeróbios (PATEL e THIBAUT, 2009).

O  $k_{LA}$  é definido como o produto de dois termos: o coeficiente convectivo de transferência de massa do filme líquido ( $k_L$ ) e a área interfacial de troca de massa ( $a$ ). Ambos dependem de uma série de variáveis, não sendo fácil medir e quantificar cada uma delas, já que os fenômenos ocorrem simultaneamente e a importância muda com a escala e tipo de biorreator. O coeficiente convectivo de transferência de massa é fortemente influenciado pelas condições hidrodinâmicas, operacionais, propriedades físico-químicas da cultura, parâmetros geométricos do biorreator e também pela presença de células que consomem oxigênio (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009).

Para a avaliação da capacidade de transferência de oxigênio de biorreatores sem a presença de células, o  $k_{LA}$  pode ser obtido experimentalmente por 3 principais métodos ou variações destes. O “método do sulfito” (COOPER et al., 1944), uma metodologia clássica que usa como base a reação de oxidação de sulfito de sódio. Os outros dois métodos são denominados “dinâmicos” e têm por princípio o acompanhamento da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

As mudanças nas concentrações de oxigênio podem ser provocadas por um gás inerte, nitrogênio, que promove a dessorção do oxigênio do meio para posterior absorção. Ou por meio da variação na pressão do reator, que provoca mudança na pressão parcial de oxigênio. Em ambos os métodos é necessário levar em conta o tempo de resposta do eletrodo, sendo este um parâmetro crítico para a determinação dos valores com precisão. Melhorias e simplificações desses métodos vêm sendo feitas no sentido de facilitar a matemática e melhorar a precisão (SCARGIALI et al., 2010; PATEL e THIBAUT, 2009).

Os métodos até aqui citados são importantes, mas não são aplicáveis em cultivos de microrganismos, devido à influência da respiração celular. Para cultivos, o princípio de medição pode ser semelhante, tratando-se também de um método dinâmico, onde o fornecimento de gás é desligado e o próprio microrganismo provoca a variação da concentração

de oxigênio com o tempo, através dessa variação é possível quantificar a respiração celular. Com o retorno da aeração e já sabendo o valor da respiração celular é então possível determinar o  $k_{La}$ . Além desse método, outro comumente utilizado é o método do balanço gasoso, onde as correntes de entrada e saída e o caldo do cultivo são constantemente monitoradas em relação às concentrações de oxigênio e gás carbônico (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009; BADINO, 1997).

As equações 1 e 2 expressam o balanço de massa de oxigênio sem e com microrganismos, respectivamente. Pode-se observar que a única diferença é o termo de consumo de oxigênio na Equação 3.7. É através dessas equações que o  $k_{La}$  é quantificado, variando-se a concentração de oxigênio dissolvido (OD) com o tempo.

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_{La} (C_{O_2S} - C_{O_2}) \quad (3.6)$$

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_{La} (C_{O_2S} - C_{O_2}) - Q_{O_2} C_x \quad (3.7)$$

A agitação e aeração melhoram o  $k_{La}$  devido principalmente a dois fatores: a diminuição da espessura da película estagnada da fase líquida, o que facilita a transferência de massa e aumenta o valor de  $k_L$  e devido a fragmentação das bolhas de gás, o que acarreta a diminuição do tamanho das bolhas e o aumento da área interfacial de transferência de oxigênio (a) e, conseqüentemente, do produto  $k_{La}$  (BADINO, 1997).

Existe na literatura várias correlações para estimativas do  $k_{La}$ . Essas correlações relacionam diferentes variáveis, condições operacionais do biorreator e fatores dimensionais ou adimensionais do sistema.

Em estudos realizados por Bakri et al. (2002), os valores de  $k_{La}$  obtidos através de balanço gasoso em cultivo de *A. niger* situaram-se na faixa de 0,028 a 0,056  $s^{-1}$  em condições de agitação e aeração de 600 a 900 rpm e 0,5 a 1,0 vvm, respectivamente. A combinação DT4-HTPG4 apresentou valores de  $k_{La}$  ligeiramente superiores à combinação DT4-DT4.

Em estudo também já citado de Tang et al. (2015), impelidores Rushton (RT) e impelidores axiais (Whu) foram também comparados em relação à transferência oxigênio. Os autores realizaram simulação em CFD para avaliar os valores de  $k_{La}$  dos sistemas em diferentes pontos. Encontraram valores médios de  $k_{La}$  entre 0,0185 e 0,0175  $s^{-1}$  para os impelidores RT e Whu, a 400 rpm e 1 vvm, com valores máximos de  $k_{La}$  de 0,030  $s^{-1}$ . Os resultados mostraram valores semelhantes de  $k_{La}$  para os dois sistemas, porém a distribuição de  $k_{La}$  foi mais

homogênea para o sistema formado pelos impelidores Whu.

No estudo da transferência de oxigênio por diferentes impelidores realizado por Bustamante (2013) a faixa de valores de  $k_{LA}$  obtida experimentalmente para fluído newtonianos foi de 0,012 a 0,115  $s^{-1}$  em biorreator convencional agitado com dois impelidores Rushton. Nesse mesmo estudo foram testados nas mesmas condições os impelidores orelha de elefante individualmente (EEUP e EEDP), obtendo-se faixas de  $k_{LA}$  de 0,005 a 0,103  $s^{-1}$  e 0,006 a 0,066  $s^{-1}$ , respectivamente. Foram também realizados os mesmos testes para fluídos não newtonianos encontrando os valores de  $k_{LA}$  na faixa de 0,0143 a 0,0813  $s^{-1}$ ; 0,00622 a 0,0498  $s^{-1}$  e 0,0043 a 0,0366 para os impelidores RT, EEUP e EEDP, respectivamente.

### 3.3.3 Velocidade de cisalhamento média

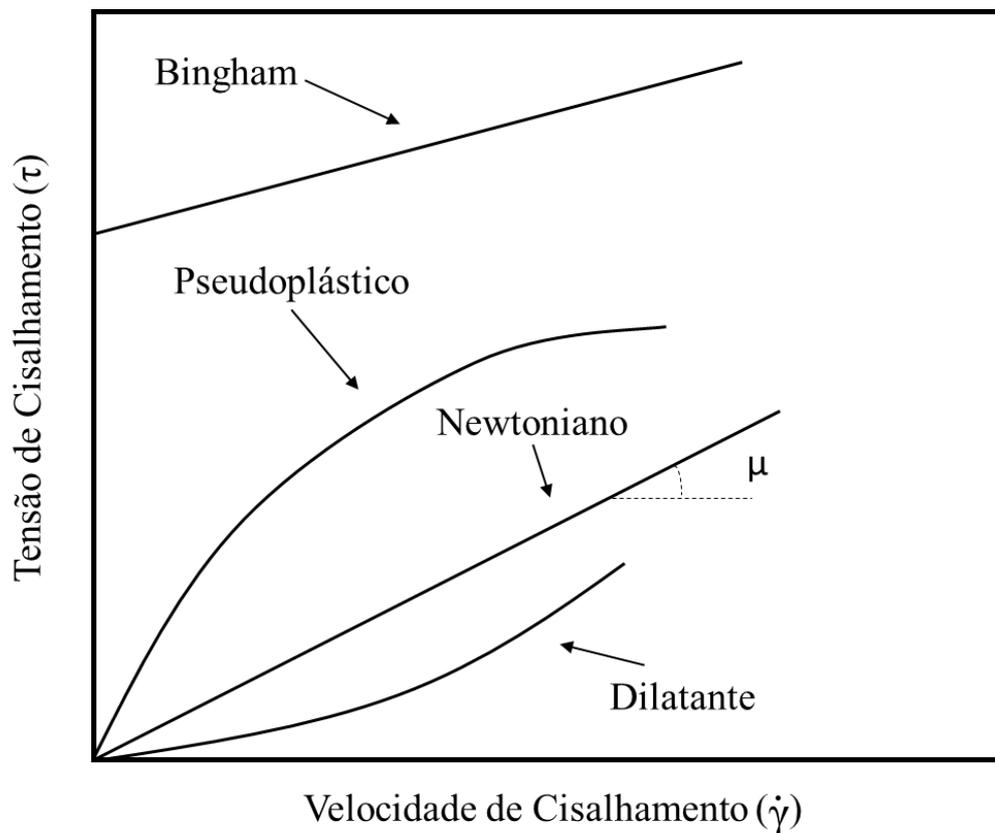
A velocidade de cisalhamento é uma importante variável no projeto e operação de biorreatores. Altos cisalhamentos podem causar danos irreversíveis às células podendo levar até a sua morte. Porém, um certo grau o cisalhamento é benéfico, pois ele diminui a viscosidade do caldo melhorando a transferência de massa e energia, além de favorecer a produção de alguns compostos.

Cada tipo de fluído tem um comportamento diferente. Em alguns a viscosidade é constante (Newtonianos) enquanto para outros (não-Newtonianos) ela varia com a velocidade de cisalhamento. O comportamento da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento de alguns fluídos pode ser visualizado na Figura 3.7.

Como pode ser observado, para os fluídos pseudoplásticos, como os caldos de cultivo com fungos filamentosos, a relação entre a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e a velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) não é linear, sendo expressa pelo modelo de lei de potência de Ostwald de waele.

O aumento da velocidade de cisalhamento leva a diminuição da viscosidade aparente em caldos pseudoplásticos. Nos biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, a velocidade de cisalhamento varia principalmente com a frequência de rotação do impelidor (N), sendo que a magnitude da variação depende também da localização e das propriedades do fluído (CHISTI, 2001).

**Figura 3.7** - Tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.



Fonte: Adaptado Cerri (2009).

Nesse sentido, existem diversas correlações na literatura para previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ). A maioria dessas correlações relacionam  $\dot{\gamma}_m$  com a frequência de rotação do eixo do agitador (N), outras além de N levam em consideração também as propriedades do fluido e condições de aeração. Algumas dessas correlações podem ser vistas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Correlações para previsão do cisalhamento médio.

Correlações	Informações	Referências
$\dot{\gamma}_m = 13 N$	Rushton 6 pás Regime Laminar não-Newtoniano	Metzner e Otto (1957)
$\dot{\gamma}_m = 64,3 N$	Impelidor axial Regime transiente Newtoniano e não- Newtoniano	Kelly e Gigas, (2003)
$\dot{\gamma}_m = 33,1 N^{1,4}$	Impelidor axial Regime transiente Newtoniano e não- Newtoniano	Pérez et al. (2006)
0,5 vvm: $\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,609}{1-n}} \cdot (1,57 N^{0,467})^{\frac{2,88}{1-n}}$ 1 vvm: $\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,610}{1-n}} \cdot (1,71 N^{0,549})^{\frac{2,48}{1-n}}$	2 Rushton 6 pás Regime turbulento Não-newtoniano	Campesi et al. (2009)
RT-RT: $\dot{\gamma}_m = (1,48N^{0,65} \phi^{-0,2} K^{0,751} n^{1,193})^{\left(\frac{1-n}{0,62}\right)}$ EEDP: $\dot{\gamma}_m = (0,39N^{0,33} \phi^{-0,18} K^{0,014} n^{-0,69})^{\left(\frac{1-n}{0,52}\right)}$ EEUP: $\dot{\gamma}_m = (739,8N^{-0,19} \phi^{-0,17} K^{0,84} n^{1,34})^{\left(\frac{1-n}{0,72}\right)}$	Regime turbulento Não-newtoniano	Bustamante et al. (2014)

Fonte: Acervo Próprio.

A correlação de Metzner e Otto (1957) é uma das mais antigas encontradas na literatura e uma das mais simples, levando em consideração apenas influência da agitação no cisalhamento.

Kelly e Gigas (2003) utilizaram modelagem por fluidodinâmica computacional (CFD) e propuseram uma correlação para impelidores axiais em regime transiente. A correlação também só considerava a frequência de agitação (N) influenciando o cisalhamento. Pérez et al. (2006), baseando-se nos resultados experimentais obtidos por Kelly e Gigas (2003), obtiveram uma outra equação para a previsão de  $\dot{\gamma}_m$  com constantes um pouco diferentes e com melhor ajuste (maior coeficiente de regressão,  $R^2$ ) para o mesmo impelidor axial A315.

As correlações desenvolvidas por Campesi et al. (2009) e Bustamante et al. (2013, 2014), utilizaram-se do mesmo método, com a diferença da segunda ser um pouco mais completa por ser válida para uma faixa maior de vazão específica de ar. Tais correlações levam

em conta além da frequência de rotação, a vazão específica de ar e as propriedades do fluido.

Em estudo recente realizado por Garcia-Ochoa et al. (2015), os autores buscaram quantificar o cisalhamento de uma forma diferente, relacionando a velocidade específica de consumo de oxigênio com o estresse mecânico e danos gerados as células pelas condições hidrodinâmicas do biorreator. O método se mostrou uma forma simples de se detectar os efeitos do cisalhamento sobre a cultura.

### 3.3.4 Escala de Kolmogorov

A fragmentação de células em biorreatores ocorre quando forças de cisalhamento locais excedem a resistência à tração das hifas, devido ao seu comprimento relativamente grande, na faixa de 100 a 300  $\mu\text{m}$  (LI et al., 2002). Estudos sugerem que os mecanismos mais plausíveis de fragmentação das células são os que se baseiam na interação dos turbilhões formados devido às condições operacionais do biorreator (agitação e aeração) e às células (ROCHA-VALADEZ et al., 2007).

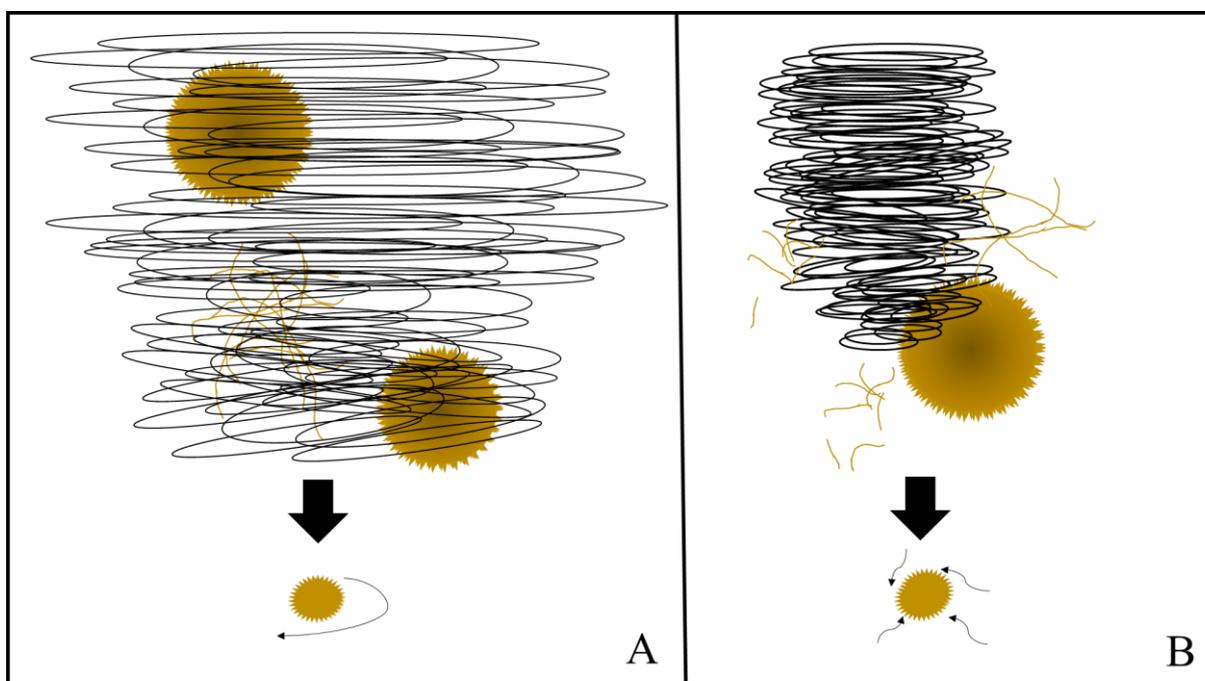
Deste modo, a teoria de Kolmogorov de turbulência isotrópica (KOLMOGOROV, 1941) tem sido empregada como base para estimar o cisalhamento de células através da microescala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) ou tamanho do menor turbilhão formado no interior do biorreator (ROCHA-VALADEZ et al., 2007). A determinação da microescala de Kolmogorov é importante porque o mecanismo responsável pela fragmentação das hifas de fungos ou bactérias depende da relação entre a dimensão destas e a do comprimento da microescala (LI et al., 2002). Turbilhões na faixa de 10 a 50  $\mu\text{m}$ , menores que as hifas de microrganismos filamentosos, levam a um aumento da interação célula-turbilhão e, conseqüentemente, geram maiores danos celulares por cisalhamento. Por outro lado, turbilhões maiores, em geral “carregam” as células fazendo com que estas sigam o escoamento dos redemoinhos turbulentos, causando menores danos (AYAZI et al., 1994; LI et al., 2002; ROCHA-VALADEZ et al., 2007). A Figura 3.8 ilustra a influência do tamanho do turbilhão no cisalhamento de células, juntamente com as etapas desse cisalhamento, onde *pellets* são transformados em *clumps* e, posteriormente, em hifas ramificadas e isoladas.

No trabalho de Collignon et al. (2010), os valores de escala de Kolmogorov obtidos para os diversos impelidores axiais ficaram na faixa de 50 a 300  $\mu\text{m}$ , com frequência de rotação (N) extrapolada para até 120 rpm. Já no trabalho de Rocha-Valadez et al. (2007), os valores da escala de Kolmogorov para impelidores Rushton em cultivo de *T. harzianum* ficaram

abaixo de 100  $\mu\text{m}$  em agitação de 600 rpm.

Lu et al. (2015b) constataram a importância do controle da morfologia para produção da enzima amiloglucosidase por *A.niger*. Um dos conceitos utilizados pelos autores para caracterizar o cisalhamento foi a escala de Kolmogorov. Em sistemas com três e duas turbinas Rushton agitados a 150 rpm, os valores da escala de Kolmogorov foram respectivamente de 870 e 900  $\mu\text{m}$ , mesma magnitude do tamanho dos *pellets* em estudo.

**Figura 3.8** - Ilustração da influência do tamanho do turbilhão no cisalhamento das células. A: Turbilhões maiores que as células “carregam” as células e causam menor cisalhamento. B: Turbilhões menores que as células interagem mais com essas e geram maior cisalhamento.



Fonte: Acervo Próprio.

Dessa forma, a presente revisão bibliográfica teve como intuito mostrar a importância do desempenho do biorreator e de seu sistema de agitação em cultivos de microrganismos. Podendo estes afetarem a economia do processo pelo consumo de potência, bem como a produção, através da transferência de oxigênio e cisalhamento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Fluídos

Soluções de glicerol (GS) foram utilizadas como fluídos Newtonianos e soluções de goma xantana (XGS) como fluídos não Newtonianos. A viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) dos fluídos Newtonianos e os parâmetros reológicos do modelo de lei da potência (índice de consistência,  $K$ , e índice de escoamento,  $n$ ) para os fluídos não-Newtonianos foram obtidos em reômetro (Brookfield Engineering Labs, Inc. USA, modelo LV-DVIII+) a 32°C. A Tabela 4.1 apresenta as propriedades reológicas dos fluídos usados no presente trabalho.

**Tabela 4.1** - Viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) e parâmetros reológicos ( $K$  e  $n$ ) dos fluídos Newtonianos e não-Newtonianos a 32°C.

Fluído Newtoniano		Fluído não-Newtoniano		
Solução glicerol (GS)	$\mu \cdot 10^3$ (Pa·s)	Sol. goma xantana (XGS)	$K$ (Pa·s <sup>n</sup> )	$n$ (-)
GS1	1,87	XGS1	0,378	0,34
GS2	3,39	XGS2	1,064	0,26
GS3	5,04	XGS3	2,068	0,21

Fonte: Acervo Próprio.

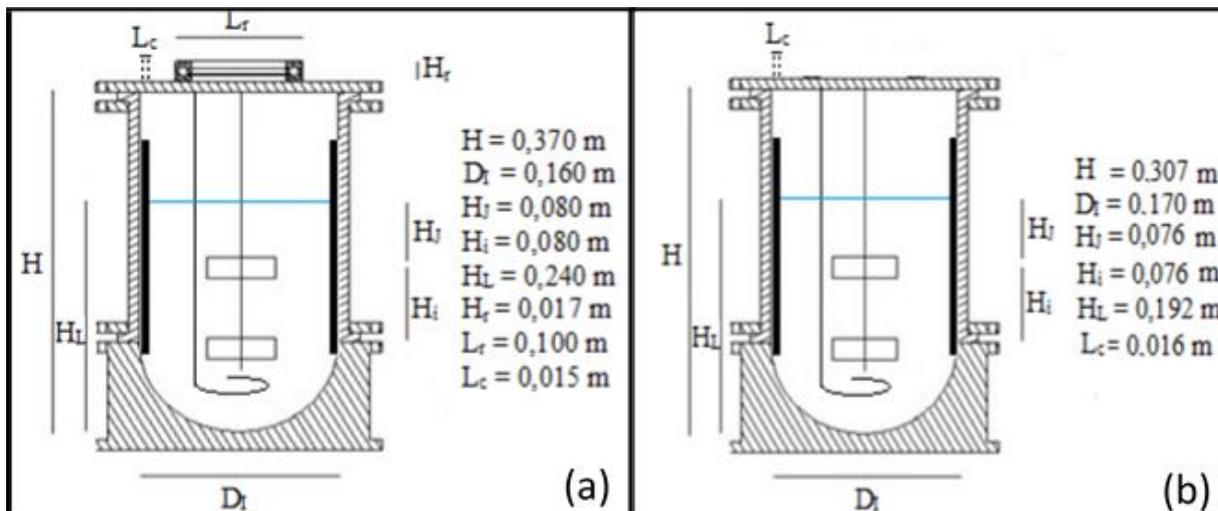
#### 4.1.2 Biorreatores

Os testes de consumo de potência foram realizados em aparato experimental proposto por Corrêa et al. (2016) e adaptado para o presente trabalho. O sistema consiste num reator tipo tanque agitado e aerado com volume de trabalho de 4 L e diâmetro interno de 0,16 m, provido de um motor de indução acoplado a um rolamento situado na tampa do reator.

Os experimentos para determinação de  $k_{LA}$  e os cultivos de *A. niger* foram realizados em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado modelo Bioflo II (New Brunswick Scientific, USA) de 5 L de volume e diâmetro interno de 0,17 m, sendo o volume de fluído utilizado nos ensaios de 4 L.

Um esquema com as principais dimensões dos biorreatores pode ser visualizado na Figura 4.1.

**Figura 4.1** - Imagem e principais dimensões biorreatores utilizados (a) Ensaios de consumo de potência (b) Ensaios  $k_L a$  e cultivos.

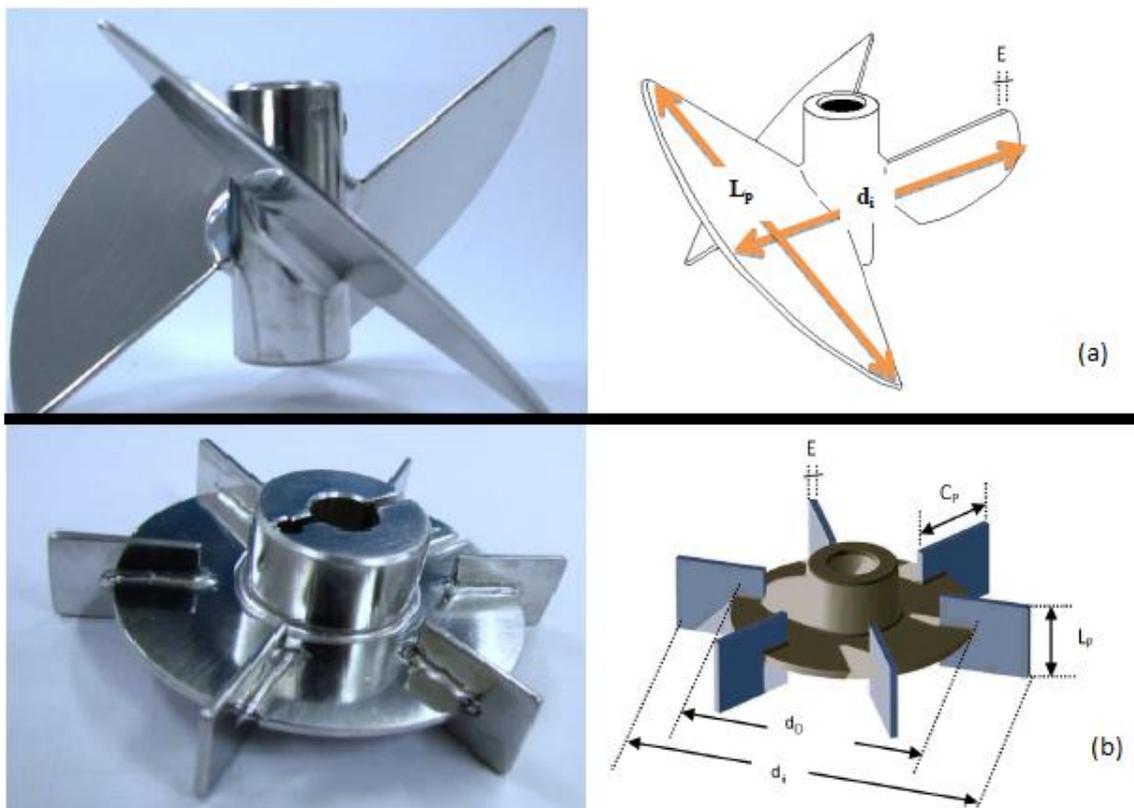


Fonte: Adaptado Corrêa et al. (2016).

#### 4.1.3 Impelidores

Três tipos diferentes impelidores foram utilizados na pesquisa, a turbina de seis pás planas ou turbina Rushton (RT) com diâmetro de 0,076 m e os impelidores tipo orelha de elefante (EE) operados no modo de escoamento ascendente (*up-pumping*: EEUP) e no modo descendente (*down-pumping*: EEDP), ambos com diâmetro de 0,08 m. Ilustrações e as dimensões dos impelidores podem ser visualizadas na Figura 4.2 e na Tabela 4.2, respectivamente.

**Figura 4.2** - Foto e esquema dos impelidores. (a) Orelha de elefante (EE) (b) Rushton (TR).



Fonte: Adaptado Bustamante (2013).

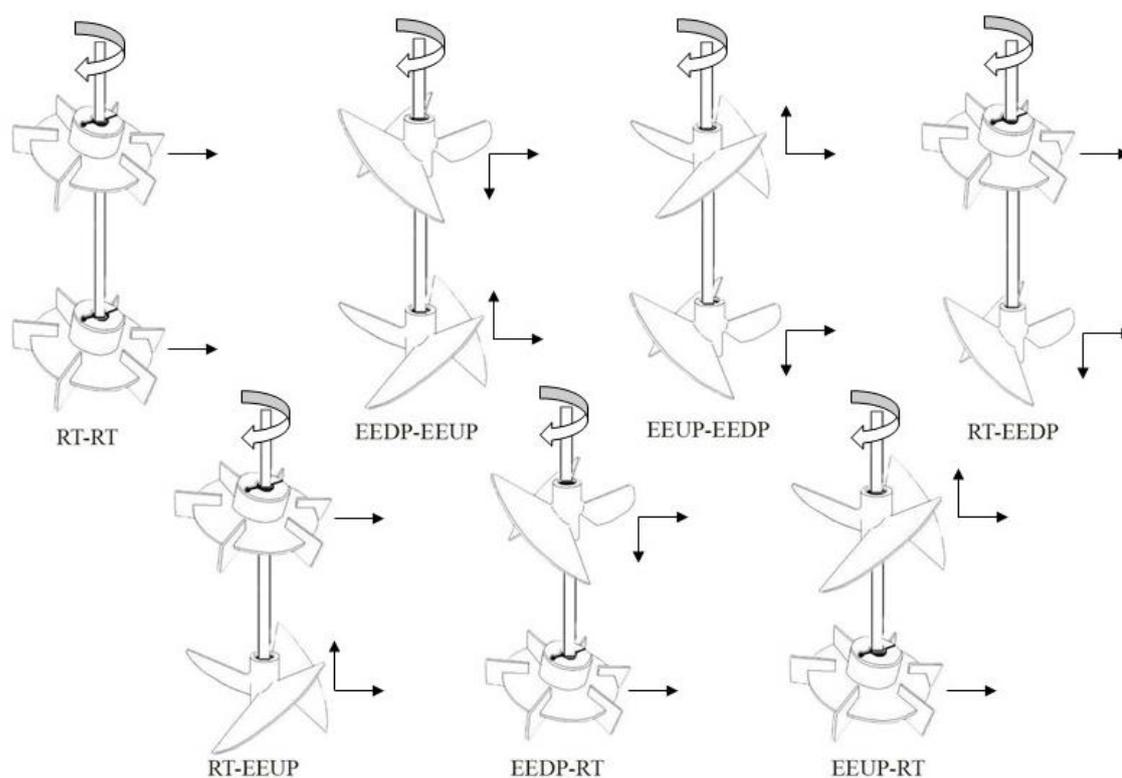
**Tabela 4.2** - Parâmetros geométricos dos impelidores.

Parâmetros geométricos	Símbolo	Dimensão (m)
<b>Orelha de elefante (EE)</b>		
Diâmetro do impelidor	$d_i$	0,080
Largura da pá	$L_p$	0,073
Espessura da pá	$E$	$1,4 \times 10^{-3}$
<b>Turbina de Rushton (TR)</b>		
Diâmetro do disco	$d_D$	0,063
Diâmetro do impelidor	$d_i$	0,076
Comprimento da pá	$C_p$	0,019
Largura da pá	$L_p$	0,016
Espessura da pá	$E$	$1,5 \times 10^{-3}$

Fonte: Acervo Próprio.

Os impelidores foram testados associados em diferentes combinações. Baseada nas combinações utilizadas por Corrêa et al. (2016). As combinações bem como a principal direção do escoamento produzido pelos impelidores estão ilustradas na Figura 4.3.

**Figura 4.3** - Esquema das associações de impelidores avaliadas.



Fonte: Acervo Próprio.

A localização dos impelidores, como sugere a Figura 4.3, foi a utilizada frequentemente em trabalhos realizados com o mesmo reator no Laboratório de Desenvolvimento de Biorreatores do DEQ/UFSCar e que se mostrou mais eficiente do que as sugeridas pelo fabricante (BUSTAMANTE, 2013). O impelidor inferior é fixado na ponta do eixo a 3,7 cm do fundo do reator e o impelidor superior a aproximadamente 7,8 cm do impelidor inferior.

#### 4.1.4 Acessórios de controle e monitoramento

Para o controle e monitoramento de parâmetros importantes dos processos nos biorreatores serão utilizados os seguintes itens acessórios:

- Fluxômetro da COLE-PARMER, modelo 33116-22 na faixa de 0 a 5 L.min<sup>-1</sup>, para o controle da vazão de alimentação de ar.
- Antiespumante Simethicone Emulsion USP da Dow Corning Medical Antifoam C, para

eventuais controle da formação de espuma.

- Analisador de oxigênio dissolvido da Mettler-Toledo, modelo O<sub>2</sub> 4100 e eletrodo de oxigênio dissolvido (InPro 6800 da Mettler Toledo, com sensor de 12 mm), provido de membranas de silicone ou teflon, para medidas da concentração de oxigênio dissolvido.
- Medidor eletrônico de pressão modelo SX990 da T&S Equipamentos eletrônicos, para controle da pressão.
- Banho termostático com circulação da Fujitec, Brasil modelo 521-2D, para o controle da temperatura.

#### *4.1.5 Equipamento para medida de potência*

Para a medida da potência consumida no biorreator utilizou-se um motor de 0,4 kW da Ringcone modelo RXMV-400, com velocidade variável da empresa Shimpo do Brasil Ltda e um dinamômetro digital da Kratos para medida da força.

#### *4.1.6 Reômetro*

Para as medidas reológicas (K e n) dos fluídos não newtonianos e viscosidades dinâmicas dos fluídos newtonianos, foi utilizado o reômetro LV-DVIII+ de cilindros concêntricos de BROOKFIELD.

#### *4.1.7 Meio de cultura e condições de cultivo*

O meio de cultivo utilizado foi o meio de Mandels e Sternberg (1976) com adaptações. No biorreator as adaptações foram realizadas para simular caldo não-newtoniano na etapa de estudo da influência da associação de impelidores na morfologia celular com a adição goma xantana e pequena quantidade de glicose para evitar crescimento do fungo. A composição do meio de cultura é mostrada na Tabela 4.3.

O valor de pH e temperatura utilizados foram de 4,5 e 32°C (CUNHA, 2011), respectivamente, na etapa de preparo do inóculo. No biorreator, o pH foi apenas monitorado e a temperatura controlada a 32°C.

**Tabela 4.3** - Composição do meio de cultura.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
Ureia	0,3
CaCl <sub>2</sub>	0,3
Peptona	5,0
Extrato de levedura	2,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
Tween 80	1,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0.10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,6.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,4.10 <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub>	2,0.10 <sup>-3</sup>
Glicose	2,5
Goma xantana	1,5

Fonte: Acervo Próprio.

#### 4.1.8 *Microrganismo*

O microrganismo utilizado nos cultivos foi uma linhagem de *A. niger* da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ), cujo os esporos foram armazenados sob condição de congelamento a -50°C.

#### 4.1.9 *Equipamentos para o cultivo do microrganismo*

- Autoclave modelo 103 da FABBER-PRIMAR industrial a 1,2 kgf/cm<sup>2</sup> e 121°C por 20 min, para esterilizar vidrarias e o meio de cultivo.
- Mesa incubadora rotativa da marca Nova Ética com controle de temperatura e rotação, para produção do inóculo.
- Câmara asséptica de fluxo laminar contendo lâmpada UV, crucial para a manipulação do microrganismo de forma asséptica.
- Ultrafreezer da marca FORMA SCIENTIFIC, importante para o armazenamento e

conservação do microrganismo.

- Microscópio ótico Olympus BX50 e câmera digital, para obter e examinar a morfologia do fungo.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Planejamento experimental

A metodologia de planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central, detalhada na Tabela 4.4, foi utilizada para definir as condições para as medidas de  $k_{LA}$  das sete associações de impelidores estudadas (Figura 4.3), com a frequência de rotação (N) variando de 600 a 1000 rpm e a vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) variando de 0,4 a 1,2 vvm. Nesta etapa do trabalho foi utilizado como fase líquida o fluido não-Newtoniano XGS2 para simular o comportamento reológico de um caldo fermentativo de fungo filamentosos. Na segunda etapa do trabalho, para três associações selecionadas, medidas de  $k_{LA}$  foram realizadas combinando todos os valores de N (600, 800 e 1000 rpm) e  $\phi$  (0,4; 0,8 e 1,2 vvm) utilizando todos os fluidos descritos na Tabela 4.1.

**Tabela 4.4** - Metodologia do planejamento fatorial  $2^2$  detalhando as variáveis de entrada (Agitação e Aeração) de cada ensaio realizado.

<b>Planejamento fatorial <math>2^2</math></b>		
<b>Ensaio</b>	<b>Agitação (N) (rpm/cód.)</b>	<b>Aeração (<math>\phi</math>) (vvm/cód)</b>
1	600 (-1)	0,4 (-1)
2	1000 (1)	0,4 (-1)
3	600 (-1)	1,2 (1)
4	1000 (1)	1,2 (1)
5	800 (0)	0,8 (0)
6	800 (0)	0,8 (0)
7	800 (0)	0,8 (0)

Fonte: Acervo Próprio.

#### 4.2.2 Medidas de consumo de potência

O consumo de potência foi determinado experimentalmente como descrito na revisão bibliográfica do presente trabalho. Sendo a potência (P) calculada como produto entre o torque (T) requerido para a agitação do fluido e a velocidade angular ( $\omega=2\cdot\pi\cdot N$ ). O comprimento do braço (br) utilizado foi de 0,175 m e a força (F) foi medida por um dinamômetro. Desta forma, o consumo de potência pode ser calculado de forma direta pela Equação 4.1.

$$P = 1,1 \cdot F \cdot N \quad (4.1)$$

#### 4.2.3 Medida do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ )

O valor do coeficiente de transferência de massa foi determinado através de medidas experimentais da concentração de oxigênio dissolvida com o tempo, obtidas através de ensaio degrau pelo método dinâmico da pressão (Blažej et al. 2004), onde a pressão é variada abruptamente em  $\pm 15$  kPa por obstrução da tubulação de saída. A constante de tempo de atraso ou sensibilidade do eletrodo ( $k_e$ ) foi calculada como o inverso do tempo de resposta ( $\tau_e$ ), sendo este o tempo necessário para a concentração de oxigênio variar de zero até 63,4% do fundo de escala (Aiba et al., 1973). O método de mínimos quadrados não linear, baseado no algoritmo de Marquardt (1963) foi usado como algoritmo de otimização e estimativa de  $k_{La}$ . A Equação 4.2 mostra a equação a ser otimizada.

$$C_e = C_{e0} e^{-k_e(t-t_0)} + C_{es} \left( 1 - e^{-k_e(t-t_0)} \right) + \frac{k_e(C_{es}-C_0)}{k_e - k_{La}} \left( e^{-k_e(t-t_0)} - e^{-k_{La}(t-t_0)} \right) \quad (4.2)$$

Sendo  $C_{e0}$  e  $C_{es}$  as concentrações de oxigênio dissolvido no sensor no tempo zero e na saturação, respectivamente.

#### 4.2.4 Eficiência de transferência de massa

Para que os dois parâmetros (P e  $k_{La}$ ) pudessem ser analisados conjuntamente, definiu-se uma eficiência energética de transferência de massa ( $E_{TM}$ ), conforme Equação 4.3.

$$E_{TM} = \frac{k_L a}{P} \quad (4.3)$$

$E_{TM}$  é expressa pela razão entre coeficiente de transferência de oxigênio e consumo de potência e sua unidade dada em termos de 1/J. Representa a transferência de oxigênio por cada J de potência consumida.

#### 4.2.5 Correlação para a velocidade de cisalhamento média

Para fluídos newtonianos, a velocidade de cisalhamento pode ser calculada através da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e da viscosidade dinâmica do fluído ( $\mu$ ). Para tais fluídos  $\tau$  é proporcional a velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) e esta proporcionalidade é dada pela viscosidade dinâmica, conforme a Equação 4.4.

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (4.4)$$

Para fluídos não-Newtonianos pseudoplásticos, a relação entre tensão e a velocidade de cisalhamento não é linear, sendo o comportamento de tais fluídos descrito pelo modelo matemático de Ostwald-de waele ou lei de potência.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4.5)$$

Utilizando-se de uma analogia com os fluídos newtonianos é possível determinar uma viscosidade dinâmica aparente ( $\mu_{ap}$ ) para os fluídos pseudoplásticos.

$$\mu_{ap} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (4.6)$$

A metodologia proposta e posteriormente modificada (Cerri et al, 2008; Campesi et al, 2009; Bustamante et al, 2013-2014) utiliza como parâmetro característico o  $k_L a$ , uma vez que o cisalhamento, assim como a transferência de oxigênio, são fenômenos que ocorrem na interface gás-líquido do biorreator. Para fluídos newtonianos e em biorreator convencional onde a agitação tem forte influência, o  $k_L a$  pode ser correlacionado com a frequência de rotação (N), com a vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) e com a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ).

$$k_L a = b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot \mu^e \quad (4.7)$$

Utilizando-se novamente da analogia entre os dois fluídos, a Equação (4.7) é válida para ambos, sendo que para os fluídos pseudoplásticos, a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) é substituída pela viscosidade dinâmica aparente ( $\mu_{ap}$ ).

$$k_L a = b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot (K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1})^e \quad (4.8)$$

Rearranjando a Equação (4.8), obtém-se a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) em função do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), das condições de operação do reator ( $N$  e  $\phi$ ) e dos parâmetros reológicos do fluído ( $K$  e  $n$ ).

$$\dot{\gamma}_m = \left[ \frac{k_L a}{b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot K^e} \right]^{\frac{1}{e \cdot (n-1)}} \quad (4.9)$$

O valor de  $k_L a$  em cultivos de microrganismos que geram caldos pseudoplásticos pode ser medido experimentalmente, porém também é possível estimar esse valor através de uma correlação do tipo:

$$k_L a = f \cdot N^g \phi^h \cdot K^i \quad (4.10)$$

Substituindo a Equação (4.10) na Equação (4.9), obtém-se a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) como função apenas das condições de operação do reator ( $N$  e  $\phi$ ) e dos parâmetros reológicos do fluído ( $K$  e  $n$ ).

$$\dot{\gamma}_m = [x \cdot N^y \cdot \phi^w \cdot K^z]^{\frac{1}{e \cdot (n-1)}} \quad (4.11)$$

Onde  $x = f - b$ ;  $y = g/c$ ;  $w = h/d$ ;  $z = i/e$ .

#### 4.2.6 Escala de Kolmogorov

A escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) pode ser avaliada através da taxa de dissipação de energia cinética ( $\varepsilon$ ) e da viscosidade cinemática do fluido ( $\nu$ ).

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} \quad (4.12)$$

A rigor, a taxa de dissipação de energia cinética varia em cada ponto do reator, porém com o intuito comparativo, ela pode ser aproximada satisfatoriamente pela dissipação de potência (Collignon et al. 2010).

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\left(\frac{P}{\rho \cdot V}\right)}\right)^{1/4} \quad (4.13)$$

A viscosidade cinemática ( $\nu$ ) é definida pela razão entre a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) e a massa específica do fluido ( $\rho$ ):

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (4.14)$$

A escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função de  $\mu$  para fluídos Newtonianos ou para fluídos não-Newtonianos em função de  $\mu_{ap}$  pode ser obtida substituindo a Equação (4.14) na Equação (4.13):

$$\lambda = \left(\frac{\mu_{ap}^3}{\left(\frac{P}{V}\right) \cdot \rho^2}\right)^{1/4} \quad (4.15)$$

A viscosidade dinâmica aparente ( $\mu_{ap}$ ) é dada pela Equação (4.6) e quando substituída na Equação (4.15), permite o cálculo da escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) pela Equação (4.16).

$$\lambda = \left(\frac{(K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1})^3}{\left(\frac{P}{V}\right) \cdot \rho^2}\right)^{1/4} \quad (4.16)$$

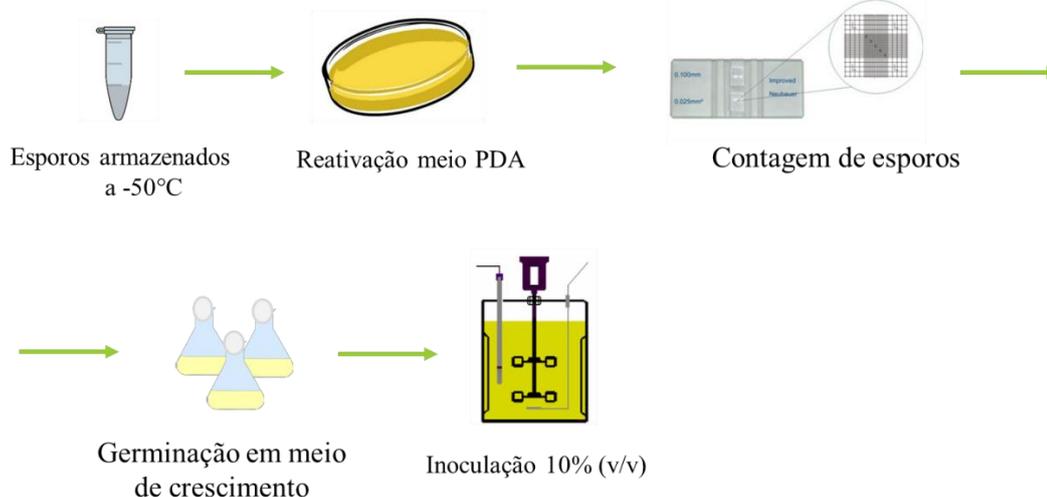
Finalmente, substituindo-se a Equação (4.11) na Equação (4.16), obtém-se a escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições de operação ( $N$  e  $\phi$ ), das propriedades físicas do fluido ( $K$ ,  $n$  e  $\rho$ ) e da potência consumida por unidade de volume ( $P/V$ ).

$$\lambda = \left( \frac{K^{\frac{3(z+e)}{e}} \cdot (x \cdot N^y \cdot \phi_{ar}^w)^{\frac{3}{e}}}{\left(\frac{P}{V}\right) \cdot \rho^2} \right)^{1/4} \quad (4.17)$$

#### 4.2.7 Metodologia experimental dos cultivos

Os cultivos foram realizados na forma submersa em biorreator convencional com curta duração de 4 h, pois a intenção foi analisar e quantificar o cisalhamento provocado pelos impelidores nas células fúngicas, sem a interferência do crescimento das células ou de outros parâmetros. As etapas do cultivo estão resumidas na Figura 4.4, o que inclui a preparação do inóculo e inoculação deste no reator.

**Figura 4.4** - Resumo das principais etapas necessárias para realização de cultivo submerso em reator.



Fonte: Acervo Próprio.

As amostras foram retiradas de 1 em 1 h, sendo estas fixadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico contendo câmera digital acoplada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Consumo de potência

Planejamento experimental fatorial  $2^2$  foi utilizado para verificar as influências das condições de agitação (600(-1) – 800(0) – 1000(+1) rpm) e aeração (0,4(-1) – 0,8(0) – 1,0 (+1) vvm) no consumo de potência de cada associação de impelidores, sendo os erros experimentais calculados através de triplicata no ponto central. Os experimentos foram realizados em regime turbulento, com Reynolds superior a  $10^4$  em toda a faixa experimental e tendo goma xantana (XGS2) como fluido de trabalho para simular a reologia de um caldo fermentativo não newtoniano.

Além disso, obteve-se resultados para os sistemas não aerados, de modo a comparar a perda de potência devido à aeração em cada associação de impelidores. Resultados do consumo de potência (P) e de número de potência ( $N_p$ ) dos sistemas aerado e não aerado, bem como a relação entre consumos de potência dos sistemas aerado pelo não aerado ( $P_g/P_0$ ) são mostrados na Tabela 5.1, para todas as configurações testadas.

**Tabela 5.1** - Resultados do consumo de potência, número de potência e relação ( $P_g/P_0$ ) para os sistemas sem aeração e aerado de todas associações testadas.

ASSOCIAÇÕES	SISTEMA S/ AERAÇÃO		SISTEMA AERADO		$P_g/P_0$ (-)
	P (W)	$N_p$ (-)	P (W)	$N_p$ (-)	
<b>RT-RT</b>	17 - 58	5,0 - 6,8	11 - 49	3,6 - 4,6	0,65 - 0,85
<b>EEDP-EEUP</b>	10 - 43	2,8 - 3,2	8 - 34	2,2 - 2,6	0,78 - 0,90
<b>EEUP-EEDP</b>	13 - 52	3,4 - 4,0	12 - 51	2,9 - 4,0	0,84 - 1,03
<b>RT-EEDP</b>	15 - 50	3,8 - 5,2	9 - 43	2,8 - 3,8	0,62 - 0,87
<b>RT-EEUP</b>	14 - 53	4,0 - 4,8	11 - 48	2,9 - 4,5	0,73 - 0,98
<b>EEDP-RT</b>	15 - 46	3,4 - 5,3	6 - 29	1,7 - 2,8	0,40 - 0,64
<b>EEUP-RT</b>	16 - 63	4,7 - 5,7	11 - 55	3,2 - 4,1	0,63 - 0,88

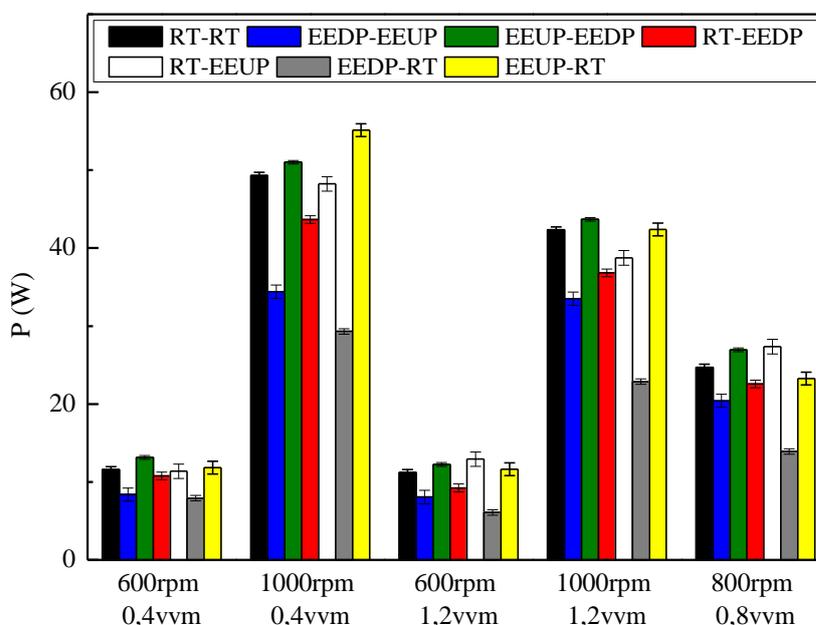
Fonte: Acervo Próprio.

Pode-se verificar pela Tabela 5.1 que de forma geral as associações de impelidores que tiveram os menores consumo (P) e número de potência ( $N_p$ ) tanto para sistema aerado como para o não aerado foram a EEDP-RT e EEDP-EEUP. Esse resultado está de acordo

com o observado por Bustamante (2013) e Zhu et al. (2009), que em trabalho realizado com os impelidores EEs, porém individualmente, constataram um menor número de potência para o EEDP. Além disso, a maior redução do consumo de potência para o sistema aerado ( $P_g$ ) foi verificada na configuração EEDP-RT, com redução de até 60% em relação sistema não aerado. Esse resultado também se mostra coerente com os apresentados pelos dois autores anteriormente citados, que verificaram maior redução do consumo de potência devido a aeração para o impelidor EEDP.

A Figura 5.1 ilustra os resultados de consumo de potência para as associações de impelidores estudadas.

**Figura 5.1** - Comparação entre o desempenho das sete diferentes associações de impelidores em termos do consumo de potência ( $P$ ) em função das variáveis agitação e aeração.



Fonte: Acervo Próprio.

Analisando a Figura 5.1 e comparando os resultados com base na associação RT-RT, que é a mais comumente usada em processos fermentativos, as associações de impelidores que apresentaram os menores consumos de potência foram as EEDP-RT e EEDP-EEUP, apresentando reduções de 45 e 30%, respectivamente, em comparação ao sistema padrão composto por duas turbinas tipo Rushton (RT-RT). Levando-se em consideração somente o consumo de potência ( $P$ ), tais associações podem trazer grandes economias a um determinado processo.

A realização do planejamento experimental também permitiu a análise da

influência de cada variável, agitação (N) e aeração ( $\phi$ ), no consumo de potência. O efeito de cada variável, bem como a informação se ela é significativa ou não, são apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Análise dos efeitos das variáveis independentes frequência de rotação (N) e vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) na variável dependente consumo de potência, para fluido não-newtoniano (goma xantana 2,5% m/v).

<b>Associação</b>	<b>N</b>	<b><math>\phi</math></b>	<b>N e <math>\phi</math></b>
<b>RT-RT</b>	34,4*	-3,3*	-3,3*
<b>EEDP-EEUP</b>	25,7*	-0,6	-0,3
<b>EEUP-EEDP</b>	34,7*	-4,1*	-3,2*
<b>RT-EEDP</b>	30,2*	-4,2*	-2,6*
<b>RT-EEUP</b>	31,3*	-4	-5,5*
<b>EEDP-RT</b>	19,1*	-4,1*	-2,3*
<b>EEUP-RT</b>	37,0*	-6,5*	-6,2*

\*indica que o efeito é significativo num nível de confiança de 95%.

Fonte: Acervo Próprio.

Observando os resultados da Tabela 5.2, verifica-se, como esperado, que para todas as associações de impelidores estudadas, o parâmetro que mais exerce influência no consumo de potência é a frequência de rotação (N), sendo esta influência positiva. Já a influência da aeração é negativa e bem menor, sendo em alguns casos (EEDP-EEUP e RT-EEUP) até insignificante. Tal influência negativa se deve principalmente ao fato das bolhas de ar diminuírem a densidade aparente do meio, facilitando a agitação do mesmo e, conseqüentemente, reduzindo a potência necessária para agitação.

Os resultados mostram a influência da disposição dos impelidores em relação ao consumo de potência, cada associação promove um padrão de escoamento diferente, o que influencia diretamente no consumo de potência.

## 5.2 Transferência de oxigênio

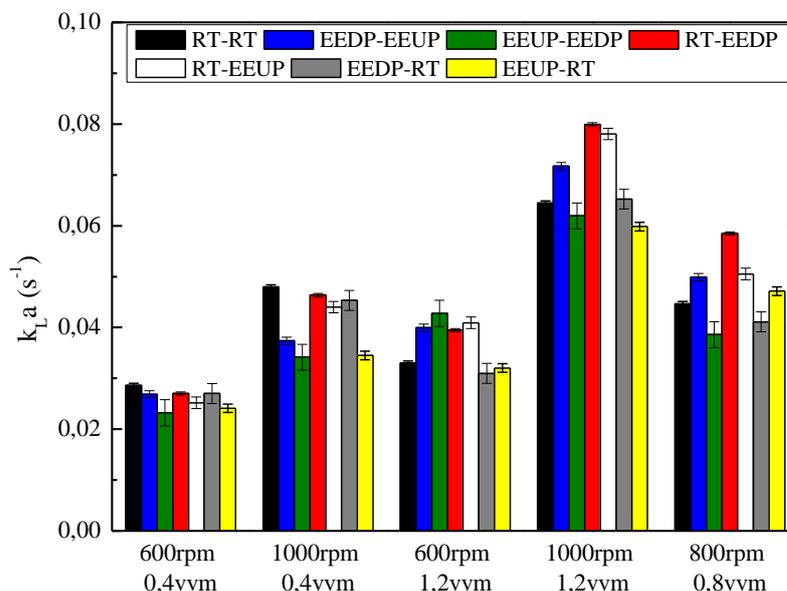
Da mesma forma que nos testes de consumo de potência, utilizando planejamento experimental fatorial  $2^2$  e XGS2, as sete diferentes associações de impelidores foram avaliadas em relação à transferência de oxigênio. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) foi utilizado como parâmetro para tal classificação. A Tabela 5.3 e a Figura 5.2 apresentam os valores de  $k_{LA}$  obtidos para cada associação de impelidores nas condições do planejamento experimental.

**Tabela 5.3** - Valores obtidos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) das associações de impelidores testadas com fluido não newtoniano (goma xantana 2,5% m/v) no planejamento fatorial  $2^2$ .

Associação	$k_{LA}$ ( $s^{-1}$ )				
	N (rpm) - $\phi$ (vvm)				
	600 - 0,4	1000 - 0,4	600 - 1,2	1000 - 1,2	800 - 0,8
<b>RT-RT</b>	0,0286	0,0480	0,0330	0,0645	0,0447
<b>EEDP-EEUP</b>	0,0268	0,0374	0,0400	0,0717	0,0499
<b>EEUP-EEDP</b>	0,0230	0,0340	0,0340	0,0620	0,0390
<b>RT-EEDP</b>	0,0270	0,0464	0,0395	0,0799	0,0585
<b>RT-EEUP</b>	0,0250	0,0440	0,0410	0,0780	0,0510
<b>EEDP-RT</b>	0,0270	0,0450	0,0310	0,0650	0,0410
<b>EEUP-RT</b>	0,0241	0,0345	0,0320	0,0598	0,0471

Fonte: Acervo Próprio.

**Figura 5.2** - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) para as diferentes associações de impelidores nas diferentes condições de aeração e agitação do planejamento experimental.



Fonte: Acervo Próprio.

A partir dos dados da Figura 5.2 e Tabela 5.3 pode-se observar bons resultados de transferência de oxigênio para todas as associações testadas. Valores de  $k_{La}$  para os impelidores EEs não associados foi de no máximo  $0,050 \text{ s}^{-1}$  no trabalho de Bustamante (2013), sendo que nos pontos do planejamento com maior aeração, o  $k_{La}$  foi maior nas associações que continham algum dos impelidores EE. Na condição de 800 rpm e 0,8 vvm (ponto central), a associação RT-EEDP apresentou valor de  $k_{La}$  31% maior em comparação à associação padrão (RT-RT). Tal fato pode ser atribuído a um escoamento diferenciado axial/radial do impelidor EEDP em conjunto com o escoamento radial do impelidor RT.

Druzinec et al. (2015) em estudo realizado com aspersor de microbolhas constataram que o impelidor EEDP apresentou valores mais elevados de  $k_{La}$  que a turbina Rushton. Tal fato foi atribuído a uma maior retenção gasosa devido às microbolhas seguirem um caminho circular no escoamento axial causado pelo impelidor. Outra análise que pode ser feita para explicar a razão da associação de impelidores RT-EEDP apresentar melhores resultados de  $k_{La}$  é o fato do impelidor RT gerar uma maior área interfacial de troca de massa (a), pois a geometria desse impelidor favorece a fragmentação das bolhas e do impelidor EEDP definir um padrão de escoamento que favorece a retenção de bolhas no sistema, aumentando a retenção gasosa com um alto número de bolhas de menor diâmetro.

Foi possível a análise da influência das variáveis agitação e aeração no  $k_{La}$ . O efeito de cada variável, bem como a informação se ela é significativa ou não, são apresentados

na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4** - Análise dos efeitos das variáveis independentes frequência de rotação (N) e vazão específica de alimentação de ar ( $\phi$ ) na variável dependente  $k_{LA}$ .

Associação	N	$\phi$	N e $\phi$
<b>RT-RT</b>	0,029*	0,012*	0,007*
<b>EEDP-EEUP</b>	0,024*	0,027*	0,012*
<b>EEUP-EEDP</b>	0,017*	0,027*	0,005
<b>RT-EEDP</b>	0,034*	0,026*	0,012*
<b>RT-EEUP</b>	0,032*	0,028*	0,010*
<b>EEDP-RT</b>	0,030*	0,014*	0,009*
<b>EEUP-RT</b>	0,022*	0,019*	0,010*

\*indica que o efeito é significativo num nível de confiança de 95%.

Fonte: Acervo Próprio.

Observando-se a Tabela 5.4, verifica-se que as influências da agitação e da aeração no  $k_{LA}$  são similares quando um dos impelidores EE encontra-se na base do reator (com pequena vantagem para agitação). Quando o impelidor Rushton encontra-se na base do biorreator esta diferença aumenta, tendo a maior diferença para a associação tradicional (RT-RT). Para as associações EEDP-EEUP e EEUP-EEDP, o efeito da aeração ( $\phi$ ) no  $k_{LA}$  foi maior do que o da agitação (N).

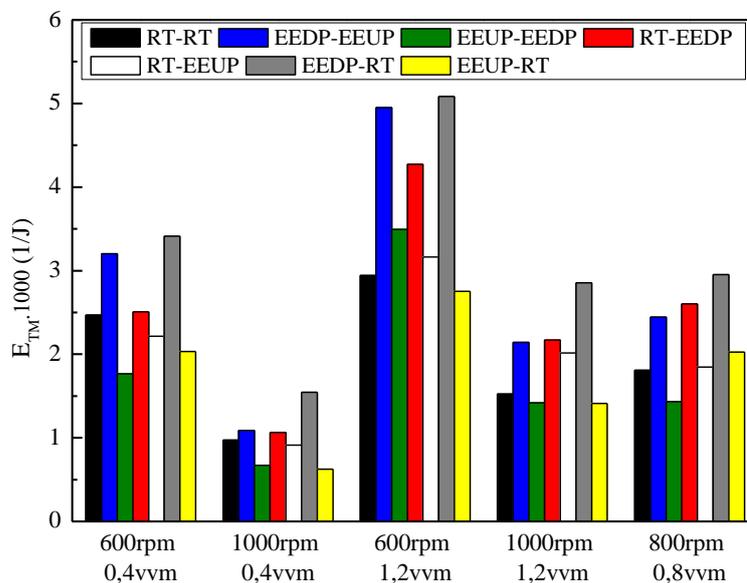
Esses resultados indicam que, de forma geral, tanto a agitação quanto a aeração têm efeito de mesma magnitude na variável  $k_{LA}$  quando os impelidores EEs são empregados, característica que os diferem do impelidor tradicional (RT) e que pode vir a ser um importante resultado dependendo do processo em que os impelidores sejam utilizados.

### 5.3 Escolha das melhores associações de impelidores

Para auxiliar na análise e definir quais as melhores associações de impelidores, utilizou-se um novo parâmetro ou critério de desempenho, a eficiência de transferência de massa ( $E_{TM}$ ), que leva em consideração tanto o consumo de potência como a transferência de oxigênio, ou seja, relacionando o  $k_{LA}$  (em  $s^{-1}$ ) por  $W$  ( $=J \cdot s^{-1}$ ) consumido. A Figura 5.3 ilustra o valor dessa variável para todas as associações de impelidores nas condições do planejamento

experimental.

**Figura 5.3** - Eficiência de transferência de massa ( $E_{TM}$ ) para as diferentes associações de impelidores nos 5 pontos do planejamento experimental.



Fonte: Acervo Próprio.

Pela análise da eficiência energética de transferência de oxigênio (Figura 5.3) é possível verificar que as associações EEDP-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP foram as melhores, sendo que a vantagem da associação EEDP-RT foi devida a seu menor consumo de potência e a vantagem da associação RT-EEDP, a sua maior transferência de oxigênio. Em termos de eficiência energética de transferência de oxigênio as vantagens das associações EEDP-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP chegam a ser, respectivamente, 87, 68 e 45% em relação ao sistema com duas turbinas Rushton (RT-RT).

A partir dos resultados obtidos de consumo de potência,  $k_{LA}$  e eficiência energética pode-se comparar melhor todas as associações de impelidores, tal comparação pode ser observada na Tabela 5.5, onde tem-se a variação de cada parâmetro e a média obtida nas cinco diferentes condições de agitação e aeração do planejamento experimental.

**Tabela 5.5** - Comparação das associações de impelidores quanto a transferência de oxigênio (valores de  $k_{La}$  médio e variação), consumo de potência (valores de potência em média e variação) e eficiência (parâmetro que leva em consideração a quantidade de oxigênio transferido por unidade de potência).

Associação	P (W)		$k_{La}$ ( $s^{-1}$ )		$E_{TM}$ ( $J^{-1}$ )	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
RT-RT	27,8	11 - 49	0,0437	0,029 - 0,065	1,9	1,1 - 2,9
EEDP-EEUP	21,0	8 - 34	0,0452	0,027 - 0,072	2,8	1,1 - 5,0
EEUP-EEDP	29,4	12 - 51	0,0401	0,023 - 0,062	1,8	0,7 - 3,5
RT-EEDP	24,6	9 - 43	0,0503	0,027 - 0,080	2,5	1,1 - 4,3
RT-EEUP	27,7	11 - 48	0,0477	0,025 - 0,078	2,0	0,9 - 3,2
EEDP-RT	16,0	6 - 29	0,0419	0,027 - 0,065	3,2	1,5 - 5,1
EEUP-RT	28,9	11 - 55	0,0395	0,024 - 0,060	1,8	0,6 - 2,8

Fonte: Acervo Próprio.

Analisando os valores da Tabela 5.5 pode-se classificar os impelidores em ordem crescente com base nos 3 parâmetros estudados, levando-se em consideração a média e os valores máximos e mínimos dos parâmetros avaliados.

Consumo de potência (P):

EEDP-RT < **EEDP-EEUP** < **RT-EEDP** < RT-EEUP < RT-RT < EEUP-RT < EEUP-EEDP

Transferência de massa - oxigênio ( $k_{La}$ ):

EEUP-RT < EEUP-EEDP < EEDP-RT < RT-RT < **EEDP-EEUP** < RT-EEUP < **RT-EEDP**

Eficiência de transferência de massa ( $E_{TM}$ ):

EEUP-RT < EEUP-EEDP < RT-RT < RT-EEUP < **RT-EEDP** < **EEDP-EEUP** < EEDP-RT

Desta forma, constatou-se que as associações de impelidores que apresentaram resultados mais interessantes foram a **RT-EEDP**, devido aos maiores valores de  $k_{La}$  e baixo consumo de potência e a **EEDP-EEUP**, pela combinação de  $k_{La}$  associada a boa eficiência de transferência de oxigênio. A transferência de oxigênio é um dos critérios de maior importância em cultivos aeróbios, o que justifica o  $k_{La}$  ter sido o critério de seleção mais importante para comparar os desempenhos dos sistemas. Sendo assim, essas duas associações (**RT-EEDP** e **EEDP-EEUP**) juntamente com a RT-RT, tradicionalmente empregada em cultivos de microrganismos aeróbios, foram as escolhidas para a sequência do estudo.

#### 5.4 Correlações para previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ )

Para verificar os níveis de cisalhamento que as associações selecionadas podem vir a causar em microrganismos filamentosos, utilizou-se o  $k_{LA}$  como parâmetro característico. O consumo de potência também foi testado como parâmetro característico para obtenção das correlações de cisalhamento, porém sem sucesso já que esta variável não variou com as diferentes reologias dos fluídos. Como mostrado pela Figura 3.6 da revisão bibliográfica, em condições de alta agitação (regime turbulento) a potência praticamente não se altera com o aumento do Reynolds, independentemente da viscosidade do fluido.

Com isso, de acordo com metodologia proposta foram primeiramente obtidas correlações de  $k_{LA}$  para fluídos Newtonianos e não-Newtonianos. As correlações de  $k_{LA}$  em função de  $N$  (em rpm),  $\phi$  (em vvm) e  $\mu$  (Pa·s) acompanhadas dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para fluídos Newtonianos são apresentadas pelas Equações 5.1 a 5.3, para as associações RT-RT; EEDP-EEUP e RT-EEDP, respectivamente.

$$\text{RT-RT: } k_{LA} = 3,76 \cdot 10^{-7} \cdot N^{0,844} \cdot \phi^{0,271} \cdot \mu^{-1,008} \quad R^2 = 0,96 \quad (5.1)$$

$$\text{EEDP-EEUP: } k_{LA} = 3,70 \cdot 10^{-7} \cdot N^{0,994} \cdot \phi^{0,342} \cdot \mu^{-0,859} \quad R^2 = 0,97 \quad (5.2)$$

$$\text{RT-EEDP: } k_{LA} = 5,18 \cdot 10^{-6} \cdot N^{0,921} \cdot \phi^{0,239} \cdot \mu^{-0,493} \quad R^2 = 0,97 \quad (5.3)$$

As correlações de  $k_{LA}$  em função de  $N$  (em rpm),  $\phi$  (em vvm) e  $K$  (Pa·s<sup>n</sup>) acompanhadas dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para fluídos não-Newtonianos são dadas pelas Equações 5.4 a 5.6 para as associações RT-RT; EEDP-EEUP e RT-EEDP, respectivamente.

$$\text{RT-RT: } k_{LA} = 3,01 \cdot 10^{-5} \cdot N^{1,106} \cdot \phi^{0,266} \cdot K^{-0,204} \quad R^2 = 0,97 \quad (5.4)$$

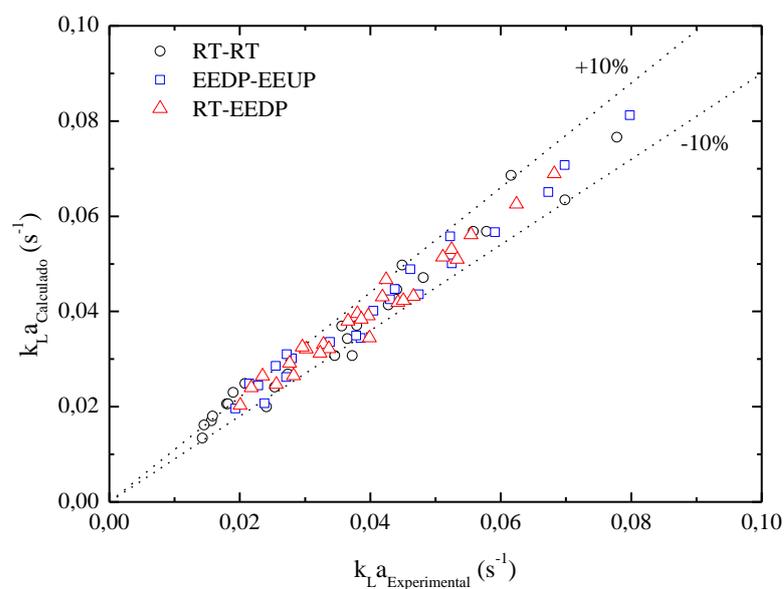
$$\text{EEDP-EEUP: } k_{LA} = 7,44 \cdot 10^{-5} \cdot N^{0,971} \cdot \phi^{0,482} \cdot K^{-0,180} \quad R^2 = 0,92 \quad (5.5)$$

$$\text{RT-EEDP: } k_{LA} = 6,89 \cdot 10^{-5} \cdot N^{1,011} \cdot \phi^{0,372} \cdot K^{-0,230} \quad R^2 = 0,96 \quad (5.6)$$

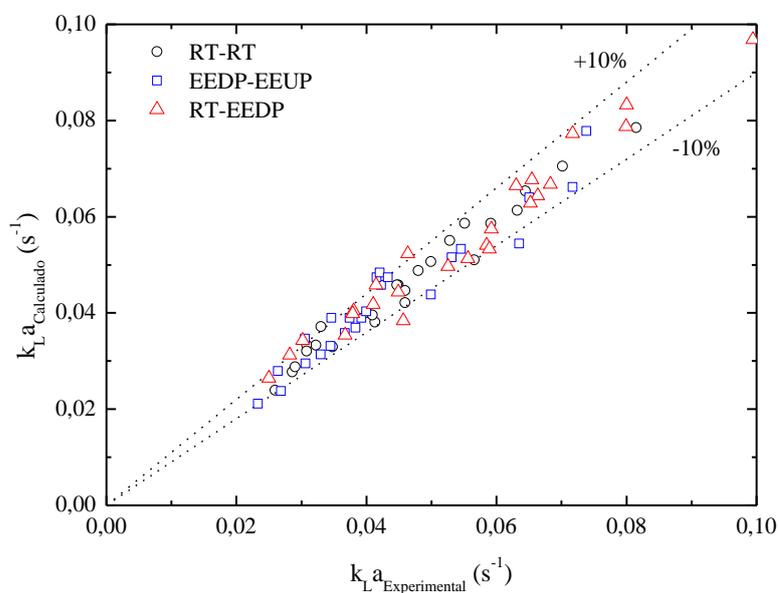
Valores satisfatórios de  $R^2$  foram obtidos, o que mostra uma boa qualidade do ajuste. Além disso, para comprovar a qualidade dos ajustes obtidos plotou-se os gráficos da

Figura 5.4 relacionando valores de  $k_L a$  calculados através das correlações em função dos valores de  $k_L a$  obtidos experimentalmente.

**Figura 5.4** - Comparação entre valores calculados e experimentais de  $k_L a$  para fluidos: (a) Newtonianos e (b) não-Newtonianos. Legenda: RT-RT (círculo/preto), EEDP-EEUP (quadrado/azul) e RT-EEDP (triângulo/vermelho).



(a)



(b)

Fonte: Acervo Próprio.

Pode-se observar na Figura 5.4 que a maioria das previsões de  $k_L a$  ficaram dentro do erro de 10% em relação aos valores experimentais, o que reforça a boa qualidade dos ajustes.

Uma vez estimados os valores dos coeficientes da Equação 4.9, foi possível obter as correlações de velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) em função de  $k_{La}$  medido durante cultivos e das condições de agitação (N em rpm) e aeração ( $\phi$  em vvm). As Equações de 5.7 a 5.9 mostram as correlações de cisalhamento obtidas para as associações RT-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP, respectivamente.

$$\text{RT-RT: } \dot{\gamma}_m = \left( \frac{k_{La}}{3,76 \cdot 10^{-7} \cdot N^{0,844} \cdot \phi^{0,271} \cdot K^{-1,008}} \right)^{0,99/(1-n)} \quad (5.7)$$

$$\text{EEDP-EEUP: } \dot{\gamma}_m = \left( \frac{k_{La}}{3,70 \cdot 10^{-7} \cdot N^{0,994} \cdot \phi^{0,342} \cdot K^{-0,859}} \right)^{1,16/(1-n)} \quad (5.8)$$

$$\text{RT-EEDP: } \dot{\gamma}_m = \left( \frac{k_{La}}{5,18 \cdot 10^{-6} \cdot N^{0,921} \cdot \phi^{0,239} \cdot K^{-0,493}} \right)^{2,04/(1-n)} \quad (5.9)$$

Tais correlações para a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) são mais adequadas, pois utiliza-se os valores experimentais de  $k_{La}$  que podem ser obtidos durante os cultivos, por exemplo, pelo método do balanço gasoso. Caldos fermentativos reais podem ter comportamento diferente da solução de goma xantana. Como forma de simplificar a obtenção de  $\dot{\gamma}_m$  e para que seja possível comparar as condições de cisalhamento das diferentes associações, utilizou-se as correlações de  $k_{La}$  obtidas para fluídos não-Newtonianos (Equações 5.4 a 5.6), expressando  $\dot{\gamma}_m$  em função apenas das condições de operação, agitação (N em rpm) e aeração ( $\phi$  em vvm) e da reologia do fluído (K e n). As equações 5.10 a 5.12 mostram as correlações de cisalhamento obtidas para as associações RT-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP, respectivamente.

$$\text{RT-RT: } \dot{\gamma}_m = (80,08 \cdot N^{0,262} \cdot \phi^{-0,006} \cdot K^{0,804})^{0,99/(1-n)} \quad (5.10)$$

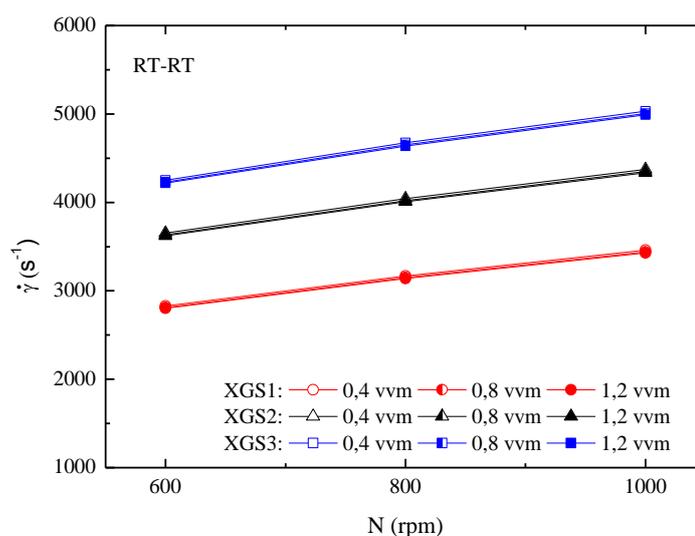
$$\text{EEDP-EEUP: } \dot{\gamma}_m = (200,87 \cdot N^{-0,023} \cdot \phi^{0,140} \cdot K^{0,679})^{1,16/(1-n)} \quad (5.11)$$

$$\text{RT-EEDP: } \dot{\gamma}_m = (13,30 \cdot N^{0,090} \cdot \phi^{0,133} \cdot K^{0,263})^{2,04/(1-n)} \quad (5.12)$$

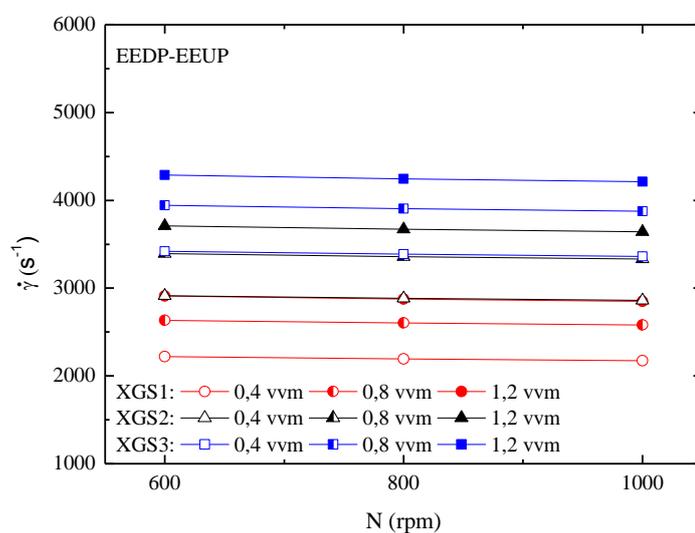
Para auxiliar na análise das correlações obtidas, os gráficos das Figuras 5.5 e 5.6,

mostram o cisalhamento em função das condições operacionais para as três associações de impelidores e uma comparação dos três impelidores em uma determinada reologia, respectivamente.

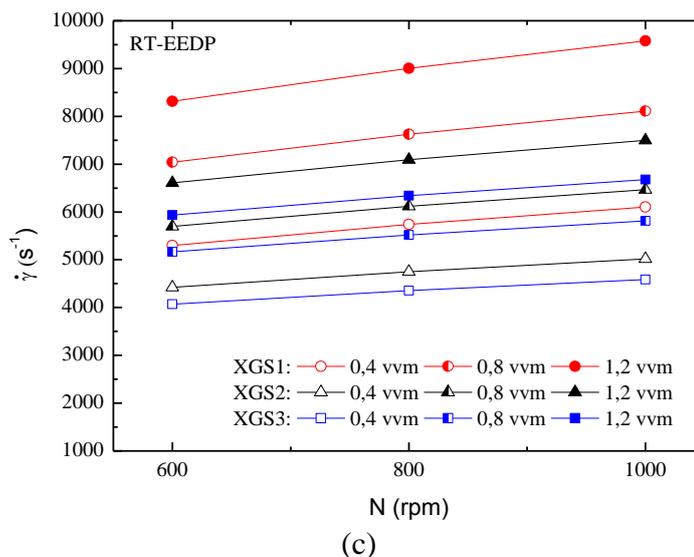
**Figura 5.5** - Taxa de cisalhamento em função das condições operacionais ( $N$  e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores RT-RT (a), EEDP-EEUP (b), e RT-EEDP (c) e para 3 soluções de goma xantana: 1,5% (vermelho/círculo), 2,5% (preto/triângulo) e 3,5% (azul/quadrado) nas aerações de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 (cheio).



(a) Obs: linhas de aeração superpostas.

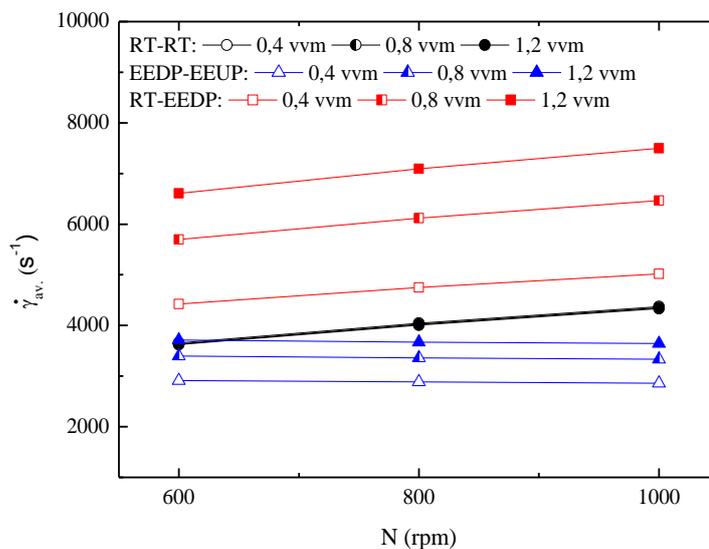


(b)



Fonte: Acervo Próprio.

**Figura 5.6** - Velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) em solução de goma xantana 2,5% m/v em função das condições operacionais (N e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores: RT-RT (círculo/preto), EEDP-EEUP: (triângulo/azul), RT-EEDP (quadrado/vermelho), nas vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 vvm (cheio).



Fonte: Acervo Próprio.

Com relação à influência de N na velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ), os impelidores RT-RT foram os que impuseram maiores valores de  $\dot{\gamma}_m$  seguidos da associação RT-EEDP. O cisalhamento gerado pela associação EEDP-EEUP praticamente não foi influenciado pela agitação. Em estudo realizado por Bustamante et al. (2013, 2014) foi constatado que o impelidor EEUP não associado teve influência negativa de N e o impelidor EEDP uma influência positiva, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Com relação ao efeito da aeração no cisalhamento, a associação que apresentou maior influência de  $\phi$  foi a RT-EEDP seguida da EEDP-EEUP, sendo essas influências positivas. Como pode ser observado na Tabela 5.2, a potência  $e$ , conseqüentemente, a transferência de quantidade de movimento sofrem pouca influência da aeração na faixa estudada, o que acaba por contribuir pouco na diminuição do cisalhamento. Por outro lado, o aumento da aeração leva a um aumento no número de bolhas formadas e que, posteriormente, eclodem na superfície do fluido agitado. Tais fenômenos levam ao aumento do cisalhamento (Li et al, 2002). Já o cisalhamento para a associação RT-RT, praticamente não sofre influência da aeração, como pode ser visto no gráfico da Figura 5.6, em que as linhas das diferentes aerações encontram-se superpostas.

Os resultados nos levam a considerar que as associações de impelidores formadas por pelo menos um impelidor EE atenuam o efeito da agitação no cisalhamento (Equações 5.10 a 5.12). Tal fato pode ser atribuído ao escoamento diferenciado das bolhas no interior reator. Uma hipótese que pode explicar o escoamento diferenciado é a maior retenção gasosa no biorreator operado com esses sistemas de impelidores (EEDP-EEUP e RT-EEDP) que pode levar a uma sobreposição da aeração em relação a agitação, tornando a segunda menos relevante no cisalhamento.

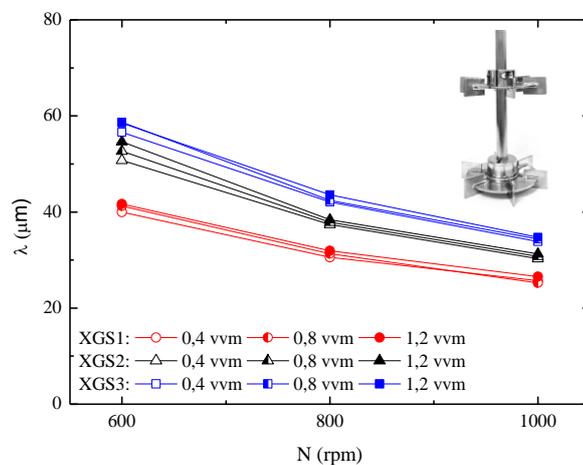
Os valores de  $\dot{\gamma}_m$  obtidos no presente estudo encontram-se na mesma magnitude dos reportadas na literatura. Extrapolando correlações obtidas por Pérez et al. (2006) e Kelly e Gigas (2003) em regime transiente de agitação para um impelidor axial, valores de  $\dot{\gamma}_m$  situaram-se na faixa de  $800-1700 \text{ s}^{-1}$  e  $600-1100 \text{ s}^{-1}$  em sistema não aerado, respectivamente. Correlações obtidas por Campesi et al. (2009) e Bustamante et al. (2013, 2014) para dois impelidores tipo Rushton apresentaram valores nas faixas de  $500-1300 \text{ s}^{-1}$  e  $1000-6000 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente, em regime turbulento de agitação. Para um impelidor EE a faixa obtida por Bustamante et al. (2013, 2014) foi de  $300-1600 \text{ s}^{-1}$  para o impelidor EEDP e de  $600-3000 \text{ s}^{-1}$  para o impelidor EEUP.

A associação que gerou os menores valores de  $\dot{\gamma}_m$  foi a EEDP-EEUP, seguida da RT-RT e da RT-EEDP. Valores de  $\dot{\gamma}_m$  para associação EEDP-EEUP chegaram a ser até 59% inferiores em relação à associação RT-RT.

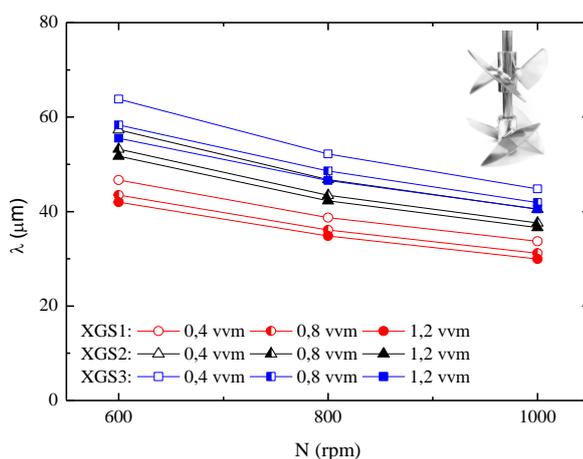
### 5.5 Microescala de Kolmogorov

Para quantificar melhor a influência das condições de cisalhamento na estrutura celular de microrganismos estimou-se valores da microescala de Kolmogorov ( $\lambda$ ), através da Equação (4.17), para as três associações de impelidores analisadas. A Figura 5.7 ilustra os valores obtidos de ( $\lambda$ ) em função das condições operacionais e das reologias de três soluções de goma xantana, cujo comportamento reológico simula a de caldos de fermentação de microrganismos filamentosos.

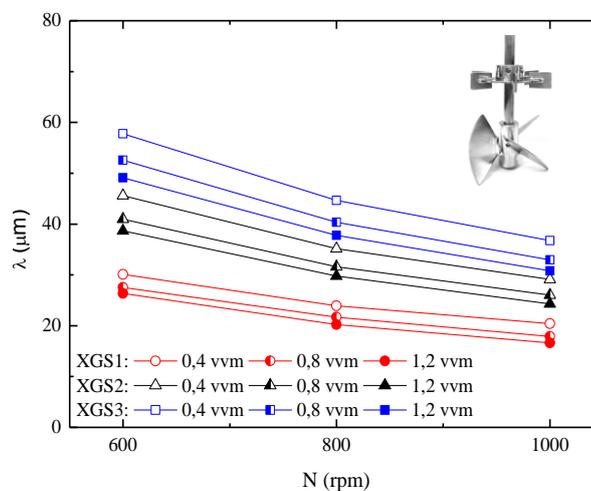
**Figura 5.7** - Escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições operacionais ( $N$  e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores, (a) RT-RT, (b) EEDP-EEUP, e (c) RT-EEDP, utilizando três soluções de goma xantana: 1,5% m/v (vermelho/círculo), 2,5% m/v (preto/triângulo) e 3,5% m/v (azul/quadrado) em vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 vvm (cheio).



(a)



(b)

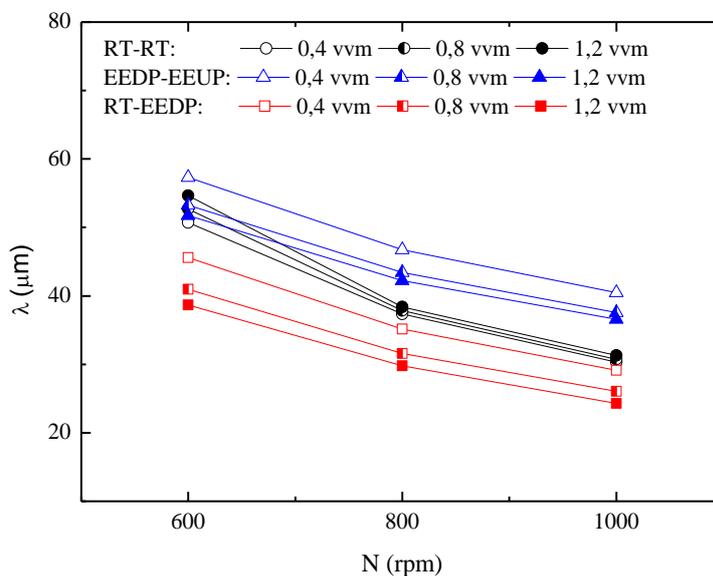


(c)

Observa-se que independentemente da associação de impelidores, a agitação apresenta influência negativa no tamanho do turbilhão ( $\lambda$ ) e deve-se, principalmente, ao aumento da potência ou da energia turbulenta. Observa-se, também, que a influência da aeração em  $\lambda$  é bem menor. No caso da associação RT-RT, a influência é quase imperceptível. Para as associações EEDP-EEUP e RT-EEDP, a influência pode ser notada mais nitidamente nas maiores reologias e é negativa, pois como visto anteriormente, o cisalhamento foi maior nas maiores aerações e a potência foi pouco influenciada pela aeração na faixa estudada. A influência da reologia em ( $\lambda$ ) foi positiva, ou seja, maiores turbilhões são formados quando o fluido está mais concentrado ou mais viscoso.

Para comparar as três associações construiu-se o gráfico da Figura 5.8, que relaciona a escala do Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições de operação (N e  $\phi$ ) para a solução de goma xantana 2,5% m/v.

**Figura 5.8** - Escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) em função das condições operacionais (N e  $\phi$ ) para as três associações de impelidores (RT-RT: preto/círculo, EEDP-EEUP: azul/triângulo, RT-EEDP: vermelho/quadrado) e solução de goma xantana 2,5% m/v nas vazões específicas de ar de 0,4 (vazio), 0,8 (meio cheio) e 1,2 (cheio).



Fonte: Acervo Próprio.

Pode-se observar no gráfico da Figura 5.8 que a associação que apresentou os maiores turbilhões foi a EEDP-EEUP, na ordem de até 60  $\mu\text{m}$ , sendo até 25% maior que os da associação RT-RT. Turbilhões maiores cisalham menos as células dos microrganismos, pois essas tendem a acompanhar o escoamento dos turbilhões. Em trabalho realizado por Colignon et al. (2010), o valor de escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) para o impelidor EEDP em baixa frequência

de rotação ( $N = 20$  rpm) foi de  $\sim 300$   $\mu\text{m}$ , sendo que para maiores valores de  $N$  ( $\sim 120$  rpm), ( $\lambda$ ) alcançou o valor de aproximadamente  $50$   $\mu\text{m}$ . No trabalho de Rocha-Valadez et al. (2007), em condições semelhantes ao do presente trabalho, regime turbulento ( $N=600$  rpm) e impelidores Rushton, os valores de escala de Kolmogorov encontrados foram inferiores a  $100$   $\mu\text{m}$ . No presente trabalho, os valores de escala de Kolmogorov ficaram na faixa de  $20$  a  $60$   $\mu\text{m}$ , em condições de agitação turbulenta ( $600 \leq N$  (rpm)  $\leq 1000$ ), sendo que esses resultados se mostram coerentes com os valores observados na literatura. Maiores valores de ( $\lambda$ ) não foram obtidos no presente trabalho em função da faixa experimental estudada ( $N$  e  $\phi$ ).

A Tabela 5.6 apresenta um resumo de todos os parâmetros e características das três associações de impelidores selecionadas.

**Tabela 5.6** - Resumo das características de transferência de massa e hidrodinâmicas das associações de impelidores (RT-RT; EEDP-EEUP e RT-EEDP) para frequências de rotação na faixa de de  $600$  a  $1000$  rpm e vazão específica de ar de  $0,4$  a  $1,2$  vvm para as soluções de goma xantana XGS1 a XGS3.

<b>Característica</b>	<b>RT-RT</b>	<b>EEDP-EEUP</b>	<b>RT-EEDP</b>
$k_{L,a}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	0,029 - 0,065	0,027 - 0,072	0,027 - 0,080
$P$ (W)	11 - 49	8 - 34	9 - 43
$E_{TM}$	1 - 3	1 - 5	1 - 4
Re	$2,0 \cdot 10^4$ - $5,5 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$ - $5,4 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$ - $1,1 \cdot 10^5$
$\dot{\gamma}_m$ ( $\text{s}^{-1}$ )	2802 - 5030	2174 - 4287	4072 - 9579
$\mu_{ap}$ (Pa.s)	$1,8 \cdot 10^{-3}$ - $2,8 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$ - $3,4 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$ - $8,9 \cdot 10^{-4}$
$\lambda$ ( $\mu\text{m}$ )	25 - 59	30 - 64	17 - 58

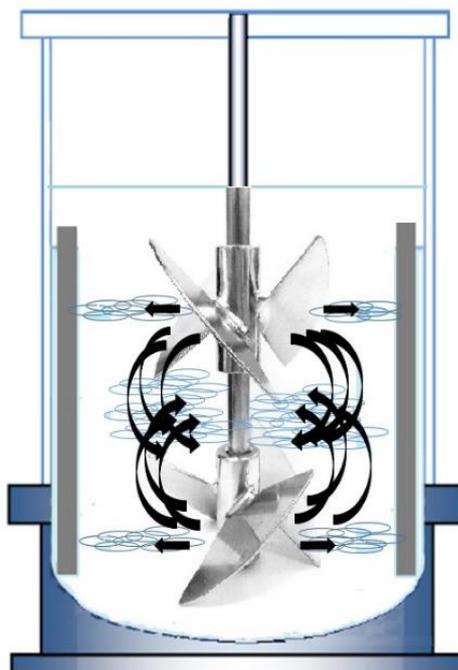
Fonte: Acervo Próprio.

De forma geral, pode-se observar que a associação EEDP-EEUP apresentou bons resultados em todos os quesitos avaliados (Tabela 5.6), tendo a menor estimativa de cisalhamento e o menor consumo de potência aliados a uma transferência de oxigênio satisfatória, que é de primordial importância para cultivos de microrganismos estritamente aeróbios como fungos e bactérias filamentosas. No trabalho de Bustamante et al. (2013, 2014),

valores de  $k_{LA}$  para os impelidores EE individuais situaram-se na faixa de  $0,004-0,037 \text{ s}^{-1}$  e  $0,006-0,05 \text{ s}^{-1}$  para os impelidores não associados EEDP e EEUP, respectivamente, enquanto no presente trabalho, com a associação de ambos os impelidores, para fluídos não-Newtonianos foram alcançados valores de  $k_{LA}$  de até  $0,072 \text{ s}^{-1}$ . Outro destaque do estudo é a possibilidade de se aumentar o valor de  $k_{LA}$  para a associação EEDP-EEUP sem aumentar o cisalhamento, pois para tal associação a agitação praticamente não influencia no cisalhamento e, por outro lado, o aumento da agitação, mesmo não sendo o parâmetro de maior efeito, leva a um aumento na transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ).

A Figura 5.9 ilustra o escoamento gerado pela associação dos dois impelidores orelha de elefante (EEDP-EEUP), destacando a boa mistura na região central e nas laterais, possível devido ao escoamento misto (axial e radial) de ambos impelidores.

**Figura 5.9** - Esquema do escoamento gerado pela associação dos impelidores EEDP (em cima) e EEUP (embaixo). As setas pretas indicam as direções dos vórtices gerados pelos impelidores, os círculos azuis indicam as regiões de maior turbulência.



Fonte: Acervo Próprio.

### 5.6 Avaliação do cisalhamento “*in vivo*” em cultivos de *A. niger*

Os cultivos para avaliação do cisalhamento tiveram duração de 4 h. Algumas informações relevantes tais como quantidade de oxigênio dissolvido, pH e reologia foram monitoradas ao longo do tempo e são apresentadas na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7** - Informações de oxigênio dissolvido, pH e reologia do caldo ao longo do cultivo.

Tempo (h)	RT-RT				EEDP-EEUP				RT-EEDP			
	OD (%)	pH (-)	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)	OD (%)	pH (-)	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)	OD (%)	pH (-)	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)
0	98,6	5,72	0,460	0,31	98,2	5,9	0,335	0,38	98	5,9	0,435	0,34
1	97,8	5,70	0,440	0,32	97,3	5,94	0,362	0,36	97,4	5,97	0,493	0,31
2	96,6	5,69	0,415	0,33	95,2	5,87	0,382	0,35	96,3	6,01	0,498	0,30
3	93,9	5,65	0,416	0,32	92,6	5,82	0,358	0,37	93,5	6,04	0,415	0,36
4	87,8	5,61	0,348	0,36	87,5	5,76	0,308	0,39	87,8	6,33	0,430	0,35

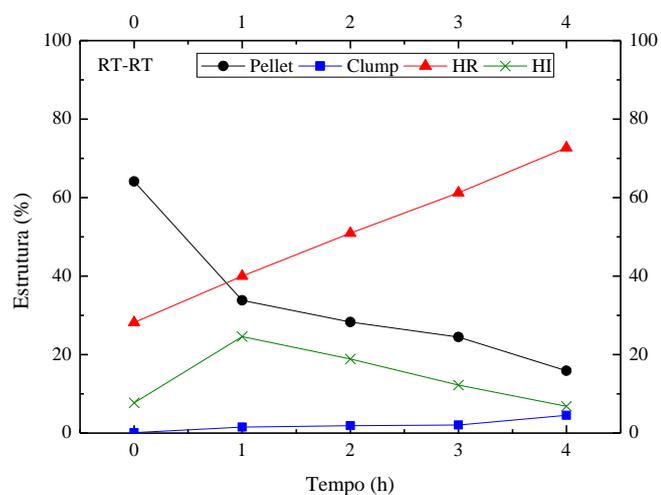
Fonte: Acervo Próprio.

Com relação ao oxigênio dissolvido, observasse valores similares para os três sistemas de imperidores, sendo esses valores altos ao longo de todos os cultivos, o que garantiu alta disponibilidade de oxigênio para sobrevivência do microrganismo, no entanto, com pequeno crescimento celular no período de tempo escolhido, verificado também pelo acompanhamento da reologia.

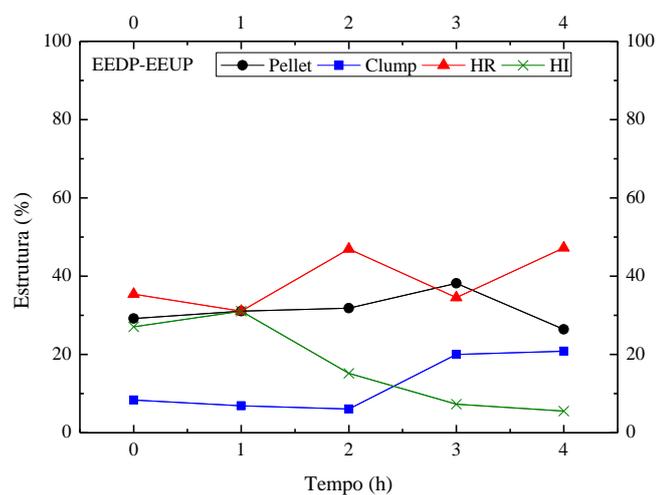
O pH e a reologia também apresentaram pequenas alterações ao longo do tempo de cultivo, o que também garante condições relativamente estáveis do microrganismo no período de tempo avaliado, permitindo uma análise do efeito do cisalhamento causado na morfologia celular por cada sistema de impelidores.

A análise do cisalhamento foi qualitativa, onde em cada hora observou-se as formas morfológicas presentes no caldo de cultivo. A Figura 5.10 mostra a porcentagem de cada estrutura morfológica observada ao longo do tempo para cada sistema de impelidores.

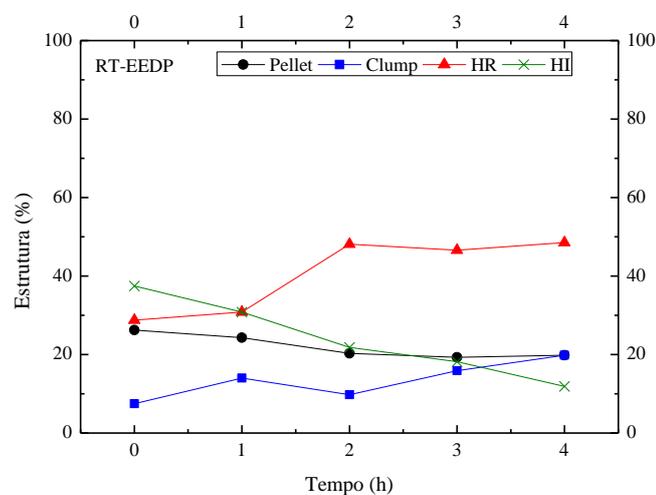
**Figura 5.10** - Porcentagem das estruturas morfológicas ao longo do tempo de cultivo: (a) Associação RT-RT (b) Associação EEDP-EEUP (c) Associação RT-EEDP.



(a)



(b)



(c)

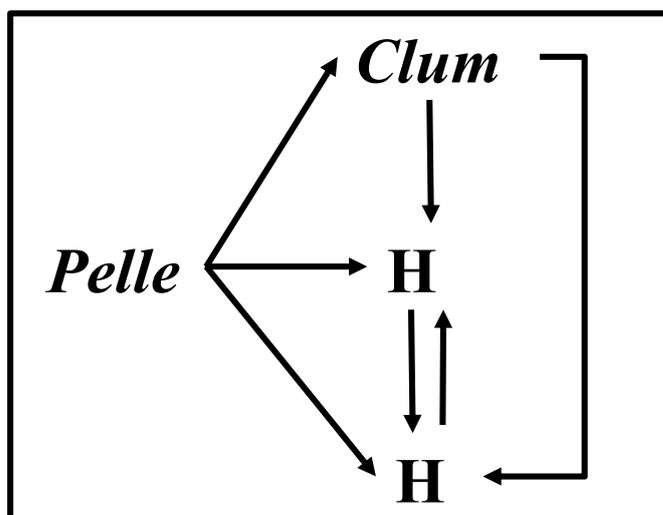
\* HR: hifas ramificadas e HI: hifas isoladas.

Observa-se mudanças mais abruptas das formas morfológicas na Figura 5.10 (a), relativa ao sistema com os impelidores Rushton (RT-RT), principalmente em relação ao desaparecimento de *pellets* e aparecimento de hifas ramificadas. As hifas isoladas aparecem no início, mas logo voltam a diminuir em porcentagem. Nota-se que na primeira uma hora há um rápido desaparecimento dos *pellets* e aparecimento tanto de hifas ramificadas como isoladas. A forma morfológica de *clumps* praticamente inexistiu durante o tempo de cultivo analisado.

Para as associações EEDP-EEUP (b) e RT-EEDP (c), a mudança na porcentagem das formas morfológicas foi mais amena. Para a associação EEDP-EEUP, o número de *pellets* se manteve praticamente constante ao longo do tempo analisado, a (%) de hifas ramificadas oscilaram, enquanto a de hifas isoladas apresentaram queda constante depois de uma hora, sendo que antes disso o aparecimento de tal forma morfológica foi praticamente inexistente. Os *clumps* apareceram de forma mais acentuada depois das duas horas de cultivo. A associação RT-EEDP apresentou comportamento semelhante, porém houve um aparecimento maior de hifas ramificadas e os *clumps* começaram a aparecer desde a primeira hora e, novamente, houve desaparecimento de hifas isoladas.

O fato das hifas isoladas desaparecerem nos três cultivos pode ser justificado pelo crescimento destas, tornando-se hifas ramificadas. Apesar do curto tempo de cultivo e da tentativa de se evitar que houvesse crescimento do fungo, um pequeno crescimento pode ter havido. A Figura 5.11 ilustra um hipotético caminho das formas morfológicas, com base na análise dos cultivos realizados.

**Figura 5.11** - Hipotética rota das formas morfológicas do microrganismo *A.niger* em cultivo de curta duração.



Fonte: Acervo Próprio.

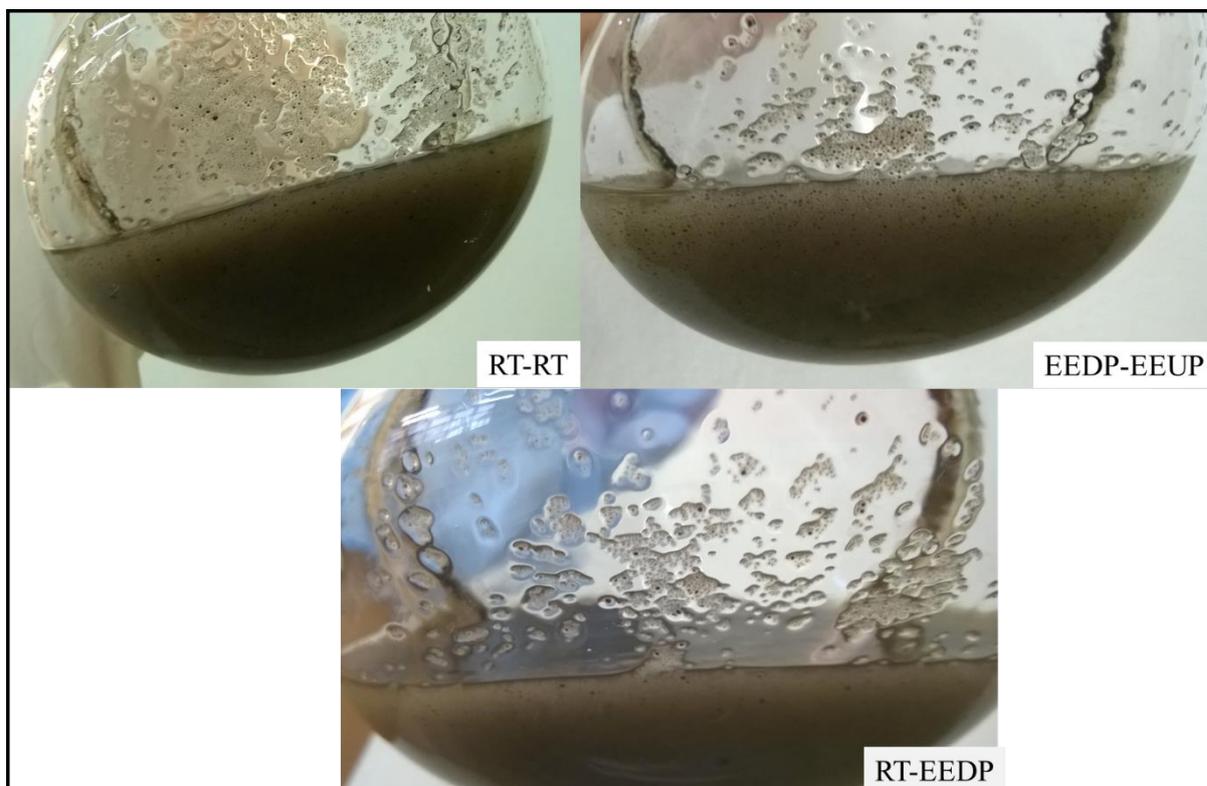
Com base na observação dos cultivos, *pellets* podem ser cisalhados gerando *clumps*, ou hifas ramificadas e hifas isoladas diretamente. Por exemplo, no cultivo com o sistema RT-RT não houve o aparecimento de *clumps*, o cisalhamento mais intenso levou ao aparecimento de hifas ramificadas e isoladas. *Clumps* podem ser cisalhados em hifas ramificadas e isoladas, porém o processo inverso provavelmente não ocorre, devido ao curto tempo de cultivo que inviabilizou crescimentos celulares mais intensos. Hifas ramificadas podem ser cisalhadas gerando hifas isoladas, porém aqui o processo inverso provavelmente deve ter ocorrido, havendo o crescimento hifas isoladas com e aparecimento das ramificações, transformando-as em hifas ramificadas.

Os resultados apresentados mostram uma tendência da associação EEDP-EEUP causar menor cisalhamento ao microrganismo, enquanto a associação RT-RT promoveu um cisalhamento mais abrupto gerando formas morfológicas menores (hifas ramificadas e isoladas). Para uma maior certeza dos resultados apresentados é necessário que os ensaios sejam realizados em duplicata e um número maior de imagens seja coletada para análise.

Além disso, apesar de macroscopicamente os inóculos serem similares como pode ser observado na Figura 5.12, as análises microscópicas mostraram consideráveis diferenças na porcentagem das formas morfológicas no início. Como pode ser observado na Figura 5.10, no início do cultivo com a associação RT-RT havia um número maior de *pellets* enquanto que para as associações EEDP-EEUP e RT-EEDP já havia quantidade maior de formas morfológicas dispersas (*clumps*, HR e HI). Tais diferenças no inóculo certamente influenciaram as formas de cisalhamento que ocorreram em cada cultivo e nas análises realizadas.

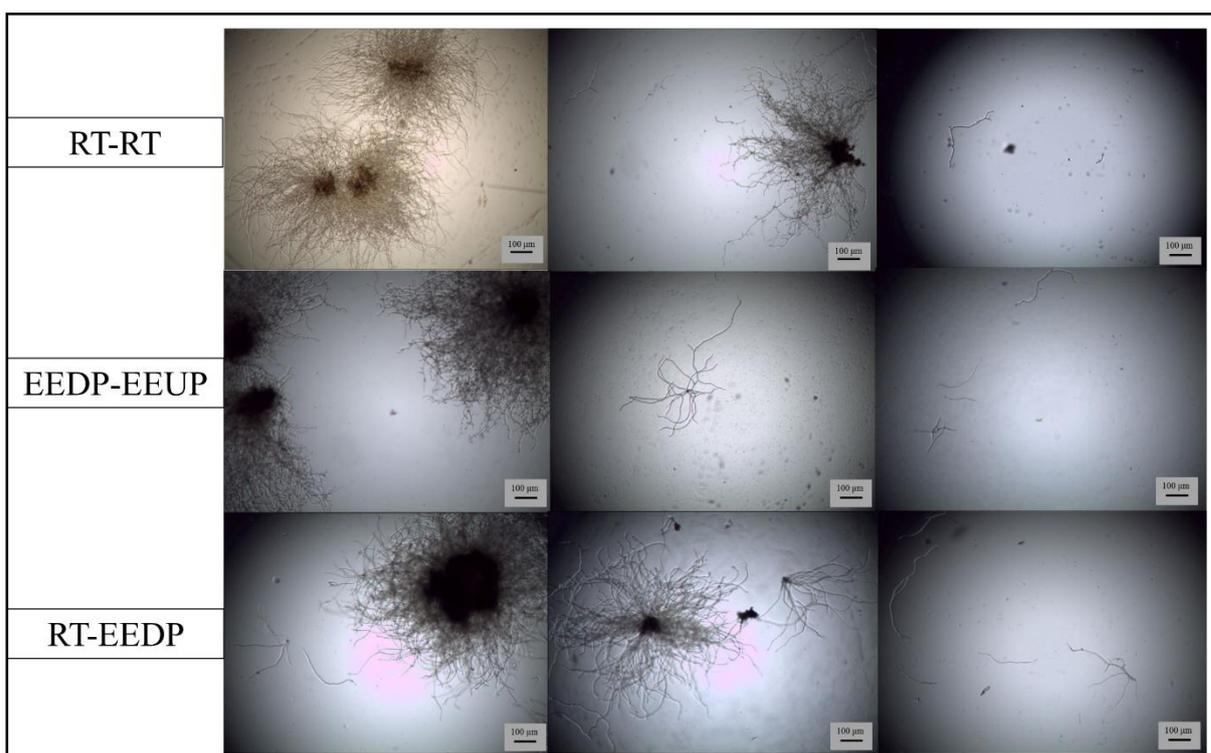
A Figura 5.3 ilustra as diversas formas morfológicas observadas durante os cultivos, com as três associações de impelidores estudadas. Nela pode-se observar que os *pellets* ultrapassam o tamanho de 300  $\mu\text{m}$ , o que justifica o cisalhamento ocorrido, visto que os tamanhos de turbilhões previstos foram inferiores a 100  $\mu\text{m}$ .

**Figura 5.12** - Imagem dos inóculos utilizados nos cultivos de *A. niger* com as três diferentes associações de impelidores (RT-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP).



Fonte: Acervo Próprio.

**Figura 5.13** - Imagens microscópicas de *A. niger* durante os cultivos com aumento de 40x.



Fonte: Acervo Próprio.

## 6 CONCLUSÕES

Com relação a transferência de oxigênio, a maioria das associações se mostraram satisfatórias, com destaque para a associação RT-EEDP, que apresentou os maiores valores de  $k_{La}$  (30% maior que a RT-RT). Além disso, verificou-se que com a associações de impelidores os valores de  $k_{La}$  aumentaram consideravelmente em relação aos valores obtidos para cada impelidor orelha de elefante individualmente, valores 30% maiores.

No consumo de potência, as associações que continham impelidores orelha de elefante de escoamento descendente (EEDP-EEUP e EEDP-RT) foram as que consumiram menos potência, respectivamente 30 e 40% menos potência que os impelidores RT-RT. Porém o menor consumo de potência levou também a uma menor transferência de oxigênio no caso do sistema EEDP-RT.

Levando em consideração os dois parâmetros de desempenho (P e  $k_{La}$ ), através da eficiência de transferência de massa ( $E_{TM}=k_{La}/P$ ), as melhores associações foram respectivamente, EEDP-RT, EEDP-EEUP e RT-EEDP, com índices 87, 68 e 45% maiores que a associação RT-RT. As associações escolhidas para continuidade do trabalho foram a EEDP-EEUP pela boa eficiência de transferência de massa e a RT-EEDP pela melhor transferência de oxigênio.

Em relação ao cisalhamento, a associação EEDP-EEUP apresentou velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) 60% menor e microescala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) 25% maior que a associação RT-RT. Portanto a associação EEDP-EEUP, provavelmente, é a menos prejudicial às células de microrganismos filamentosos, sendo que indícios disso foram verificados nos testes “*in vivo*” realizados com *A.niger*.

De forma geral, a associação EEDP-EEUP se mostrou satisfatória em relação à transferência de oxigênio, consumo de potência e cisalhamento, o que mostra que tal associação possui um bom potencial para ser utilizada em cultivo de microrganismos.

## 7 SUGESTÕES

Para continuidade do trabalho sugere-se:

- Realizar cultivos em duplicatas em diferentes condições de agitação e aeração e maior número de análises morfológicas de fungos cultivados utilizando os diferentes sistemas de impelidores, seguindo a metodologia proposta no trabalho;
- Avaliar as melhores associações de impelidores em cultivos completos de *A.niger*, verificando a produção de celulases para cada associação;
- Realizar mais estudos hidrodinâmicos para associação EEDP-EEUP, que se mostrou bastante promissora, como por exemplo ensaios de retenção gasosa e modelagem da transferência de massa e hidrodinâmica por fluidodinâmica computacional (CFD);
- Realizar estudos de aumento de escala para as melhores associações;
- Utilizar as combinações de impelidores com outros fungos produtores de celulase, como por exemplo o *T. reesei*.

## 8 REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei* morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v.100, p. 5979-5987, 2009.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.49, n.3, p.379-387, 2010.

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N.F. **Biochemical Engineering**. 2 ed, Tóquio, University of Tokyo Press, 1973.

ASCANIO, G.; CASTRO, B.; GALINDO, E. Measurement of power consumption in stirred vessels - a review. **Chemical Engineering Research and Design**, v.82 (A9), p.1282-1290, 2004.

AYAZI, S.P.; MAKAGIANSAR, H.Y.; ISON, A.P.; LILLY, M.D. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v.49, p.2621-2631, 1994.

BADINO, A.C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Power input and oxygen transfer in fed-batch penicillin productions process. **Advances in Bioprocess Engineering**. Netherlands Kluwer Academic Publishers, p.157-162, 1994.

BADINO JR., A. C. **Reologia, consumo de potência e transferência de oxigênio em cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. 1997. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.

BADINO, A. C.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2, Engenharia bioquímica, Cap. 15: Variação de escala, Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 2001.

BAKRI, Y.; JAQUES, P.; KUN SHI, L.; THONART, P. Influence of a new axial impeller on  $k_{La}$  and xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.1037-1048, 2002.

BLAŽEJ, M.; JURAŠČIK, M.; ANNUS, J.; MARKOŠ, J. Measurement of mass transfer coefficient in an airlift reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.1405-1411, 2004.

BUSTAMANTE, M. C. C. **Transferência de oxigênio e condições de cisalhamento em biorreator convencional com impelidores orelha de elefante**. 2013. 222f. Dissertação (Doutorado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BUSTAMANTE, M.C.C.; CERRI, M.O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers, **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92-100, 2013.

BUSTAMANTE, M.C.C.; CERRI, M.O.; BADINO, A. C. Corrigendum to “Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers” [Chem. Eng. Sci. 90 (2013) 92-100], **Chemical Engineering Science**, v. 107, p. 328, 2014.

CAMPESI, A.; CERRI, M. O.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.32, p.241-248, 2009.

CERRI, M.O.; FUTIWAKI, L. C.; JESUS, D.F.; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor, **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.51-57, 2008.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores *airlift* de circulação interna geometricamente semelhantes**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.

CHISTI, Y. Hydrodynamic damage to animal cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.21, p. 67-110, 2011.

COLLIGNON, M.L.; DELAFOSSE, A.; CRINE, M.; TOYE, D. Axial impeller selection for anchorage e dependent animal cell culture in stirred bioreactors: methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. **Chemical Engineering Science**, v.65, p.5929-5941, 2010.

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

CORRÊA, L.J.; BADINO, A.C.; CRUZ, A.J.G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.39, p.285-294, 2016.

CUNHA, F. M. **Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulases por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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 cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p.270-274, 2012.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; FLORENCIO, C.; VASCONCELLOS, V.M.; FARINAS, C.S.; BADINO, A.C. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method, **Biochemical Engineering Journal**, v.97, p. 32-39, 2015.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.; FONSECA, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.5-6, p.394-401, 2000.

DRIOUCH, H.; SOMMER, B.; WITTMANN, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n.6, p.1058-1068, 2010.

DRUZINEC, D., SALZIG, D., KRAUME, M., CZERMAK, P. Micro-bubble aeration in turbulent stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v.126, p.160–168, 2015.

EL-ENSHASY, E.H.A. Filamentous fungal cultures: process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier, p.225-260, 2007.

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

GABELLE, J.C.; JOURDIER E.; LICHT, R.B.; CHAABANE, B.F.; HENAUT, I.; MORCHAIN, J.; AUGIER, F. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v.75, p.408-417, 2012.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fungos: estrutura e ultraestruturas. In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. p. 15-46.

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

GARCIA-OCHOA, F.; ESCOBAR, S.; GOMES, E. Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *R. erythropolis* cultures to shear effects. **Chemical Engineering Science**, v.122, p.491-499, 2015.

GHADGE, R.S.; PATWARDHAN, A.W.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. Effect of flow pattern on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v.60, p.1067-1083, 2005.

GHOTLI, R.A.; AZIZ, A.R.A.; IBRAHIM, S.; BAROUTIAN, S.; ARAMI-NIYA, A. Study of various curved-blade impeller geometries on power consumption in stirred vessel using response surface methodology. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44, p.192-201, 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**, v.6, p.109-144, 2000.

HU, D.; JU, X.; LI, L.; HU, C.; YAN, L.; WU, T.; FU, J.; QIN, M. Improved in situ saccharification of cellulose pretreated by dimethyl sulfoxide/ionic liquid using cellulase from a newly isolated *Paenibacillus sp.* LLZ1. **Bioresource Technology**, v.201, p.8-14, 2016.

KELLY, W.; GIGAS, B. Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial-flow impellers operating in the transitional flow regime. **Chemical Engineering Science**, v.58, p. 2141-2152, 2003.

KOLMOGOROV, A. N. Dissipation of energy in the locally isotropic turbulence. *Compt. Rend. (Dokl.) Acad. Sci. URSS*, v.32, p.16-18, 1941.

KRULL, R.; CORDES, C.; HORN, H.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; NEU, T.R.; NÖRTEMANN, B. Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. **Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology**, v.121, p.1-21, 2010.

KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M.E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D.C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.163, p.112-123, 2013.

LAN, T.Q.; WEI, D.; YANG, S.; LIU, X. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v.133, p.175-182, 2013.

LI, Z.J.; SHUKLA, V.; WENGER, K.; FORDYCE, A.; PEDERSEN, A.G.; MARTEN, M. Estimation of hyphal tensile strength in production-scale *Aspergillus oryzae* fungal fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, p. 601-613, 2002.

LI, C.; YANG, Z.; ZHANG, R.H.C.; ZHANG, D.; CHEN, S.; MA, L. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p.470-477, 2013.

LIN, P.J.; SCHOLZ, A.; KRULL, 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. 213-220, 2010.

LU, F.; PING, K.; WEN, L.; ZHAO, W.; WANG, Z.; CHU, J.; ZHUANG, Y. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.50, p.1342-1348, 2015(a).

LU, H.; LI, C.; TANG, W.; WANG, Z.; XIA, J.; ZHANG, S.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; NOORMAN, H. Dependence of fungal characteristics on seed morphology and shear stress in bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.38, p.917-928, 2015(b).

MÄKELÄ, M.R.; DONOFRIO, N.; VRIES, R.P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.72, p.2-9, 2014.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Fermentation Technology**, n.54, p.256-286, 1976.

METZNER, T.; OTTO, R.E. Agitation of non-Newtonian fluids. **AIChE Journal**, v.3, p.3-10, 1957.

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.

MIRRO, R.; VOLL, K. Which impeller is right for your cell line? A guide to impeller selection for stirred-tank bioreactors. **Bioprocess International**, v.7, p.52-57, 2009.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p.189-259, 2004.

PATEL, N., CHOY, V., MALOUF, P., THIBAUT, J. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. **Process Biochemistry**, v.44, p.1164-1171, 2009.

PATEL, N.; THIBAUT, J. Enhanced in situ dynamic method for measuring  $k_{LA}$  in fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p.48-54, 2009.

PÉREZ, J.A.S., PORCEL, E.M.R., LOÓPEZ, J.L.C., SEVILLA, J.M.F., CHISTI, Y. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v.124, p.1-5, 2006

ROBSON, G.D.; PUCI, J.; THRONSET, W.; DUNN-COLEMAN, N. Oxidative stress, fragmentation and cell death during bioreactor growth of filamentous fungi. **British Mycological Society Symposia Series**, v. 27, p.129-142, 2008.

ROCHA-VALADEZ, J. A., GALINDO, E., SERRANO-CARREÓN, L. The influence of circulation frequency on fungal morphology: A case study considering Kolmogorov microscale in constant specific energy dissipation rate cultures of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, v.130, 394-401, 2007.

RUSHTON, J.H.; COSTISH, E.W.; EVERETT, H.J. Power characteristics of mixing impellers. Part I. **Chemical Engineering Progress**, v.46, p.395-404, 1950.

RUSHTON, J.H.; COSTISH, E.W.; EVERETT, H.J. Power characteristics of mixing impellers. Part II. **Chemical Engineering Progress**, v.46, p.467-476, 1950.

SARDEING, R.; AUBIN, J.; XUERE, C. Gas-liquid mass transfer: a comparison of down-and up-pumping axial flow impellers with radial impellers. **Chemical Engineering Research and Design**, v.82, p.1589-1596, 2004.

SCARGIALI, F.; BUSCIGLIO, A.; GRISAFI, F.; BRUCATO, A. Simplified dynamic pressure method for  $k_{LA}$  measurement in aerated bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p.165-172, 2010.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. 277-329.

SIMMONS, M. J. H.; ZHU, H.; BUJALSKI, W.; HEWITT, C. J.; NIENOW, A. W. Mixing in a model bioreactor using agitators with a high solidity ratio and deep blades. **Chemical Engineering Research and Design**, v.85, p.551-559, 2007.

SPXFLOW. Disponível em: <<http://www.spxflow.com/en/lightnin/pc-impellers>>. Acesso em: 16 de setembro de 2014.

SULZER. Disponível em: <<https://www.sulzer.com>>. Acesso em: 24 de outubro de 2014.

TANG, W., PAN, A.; LU, H.; XIA, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; CHU, J.; NOORMAN, H. Improvement of glucoamylase production using axial impellers with low power consumption and homogeneous mass transfer. **Biochemical Engineering Journal**, v.99, p.167-176, 2015.

TOWLER, G.P.; SINNOT, R. Chemical engineering design: principles, practice and economics of plant and process design. Elsevier, 2008. 1245p.

ZHU, H.; NIENOW, A. W.; BUJALSKI, W.; SIMMONS, M. J. H. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: power, hold-up and aerated flow field measurements. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 307-317, 2009.