

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA
CURSO ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

GEORGE BETIM DE CAMPOS

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES IMPELIDORES NA
TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATORES AGITADOS E EFEITOS
NO CULTIVO DE *Bradyrhizobium japonicum*

PONTA GROSSA

2021

GEORGE BETIM DE CAMPOS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES IMPELIDORES NA
TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATORES AGITADOS E EFEITOS
NO CULTIVO DE *Bradyrizzobium japonicum***

**Analysis of the influence of different impellers on oxygen transfer in agitated
bioreactors and effects on the cultivation of *Bradyrizzobium japonicum***

Trabalho de Conclusão de Curso de
Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia, Departamento de
Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt
Sydney

PONTA GROSSA

2021

GEORGE BETIM DE CAMPOS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES IMPELIDORES NA
TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM BIORREATORES AGITADOS E EFEITOS
NO CULTIVO DE *Bradyrhizobium japonicum***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 18/Agosto/2021

Prof. Eduardo Bittencourt Sydney
Doutor
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná

Prof. Sabrina Avila Rodrigues
Doutora
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná

Luciane Muller Martins
Mestre
UniCesumar

**PONTA GROSSA
2021**

Dedico este trabalho aos meus familiares, a minha mãe Elisa Araújo Campos, aos meus amigos, colegas de curso, colegas do laboratório de fermentações e professores, em especial, ao Eduardo Bittencourt Sydney, que me orientou desde meu primeiro ano da faculdade e contribuiu para meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

RESUMO

Os inoculantes são microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico quando estão associados simbioticamente a plantas leguminosas. O nitrogênio é um macro nutriente fundamental para o desenvolvimento da planta, devido a isso o seu consumo nas propriedades rurais vem aumentando a cada ano. O inoculante para soja é o mais comercializado, pois a soja é uma cultura exótica no Brasil e o solo brasileiro carece de microrganismos fixadores de nitrogênio específicos. O aumento do consumo de inoculante gera necessidade de se aumentar e otimizar a produção do mesmo, que é realizada industrialmente em biorreatores com agitação mecânica. Um dos microrganismos fixadores de nitrogênio utilizados como inoculante para soja é o *Bradyrhizobium japonicum*, uma bactéria aeróbia. Industrialmente, para se aumentar a eficiência na produção de inoculantes tradicionalmente são feitas alterações no meio de cultivo, pH, temperatura, aeração e agitação, mas pouca atenção tem sido dada ao projeto do biorreator. O objetivo deste trabalho é analisar a influência de diferentes modelos de impelidores e suas combinações na transferência de oxigênio em um biorreator de bancada. A melhor combinação encontrada (agitador tipo Rushton na parte inferior do eixo de agitação e orelha de elefante a 36 mm de distância) foi utilizada para realizar uma otimização dos parâmetros aeração e agitação em biorreator de bancada (2.5L) utilizando delineamento composto central rotacional. A condição ideal foi então utilizada na produção de biomassa de *Bradyrhizobium japonicum*. Foi observada uma melhora de 5,6% no tempo de geração e 12,5% na velocidade de crescimento microbiano ao se utilizar o conjunto de pás que otimiza a transferência de oxigênio no biorreator, que resultam em uma melhoria no processo produtivo reduzindo o tempo de produção.

Palavras-Chave: Inoculantes; Biorreator; Impelidores; Transferência de oxigênio.

ABSTRACT

Inoculants are atmospheric nitrogen-fixing microorganisms when they are symbiotically associated with leguminous plants. Nitrogen is a fundamental macronutrient for plant development, which is why its consumption by rural producers is increasing every year. The inoculant for soy is the most commercialized, since soy is an exotic crop in Brazil and the Brazilian soil lacks specific nitrogen-fixing microorganisms. The increase in inoculant consumption creates the need to increase and optimize its production, which is carried out industrially in bioreactors with mechanical agitation. One of the nitrogen-fixing microorganisms used as an inoculant for soybeans is *Bradyrhizobium japonicum*, an aerobic bacterium. Industrially, to increase the efficiency in the production of inoculants, changes are traditionally made in the culture medium, pH, temperature, aeration and agitation, but little attention has been given to the design of the bioreactor. The objective of this work is to analyze the influence of different impeller models and their combinations on oxygen transfer in a benchtop bioreactor. The best combination found (Rushton-type agitator at the bottom of the agitation axis and elephant ear 36 mm away) was used to optimize the aeration and agitation parameters in a benchtop bioreactor (2.5L) using a central composite rotational design. The ideal condition was then used in the biomass production of *Bradyrhizobium japonicum*. An improvement of 5.6% in generation time and 12.5% in microbial growth speed was observed when using the set of paddles that optimize the transfer of oxygen in the bioreactor, which result in an improvement in the production process by reducing time of production.

keywords: Inoculants; Bioreactor; Impellers; Oxygen transfer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Determinação do qO_2 e KLa a partir do método dinâmico	19
Figura 2 - Gráfico da concentração de oxigênio dissolvido por qO_2	19
Figura 3 - Esquema Padrão de um Biorreator	21
Figura 4 - Gráfico número de Reynolds x número de potência	23
Figura 5 - Impelidores utilizados em Bioprocessos	24
Figura 6 - Regime de escoamento radial e axial	25
Figura 7 - Impelidores utilizados.....	27
Gráfico 1 - Curvas de transferência de oxigênio	31
Gráfico 2 - Curvas de transferência de oxigênio experimental e obtidas com método numérico Fonte: Autoria própria (2021).....	32
Gráfico 3 - Gráfico de Pareto.....	34
Gráfico 4 - Gráfico dos valores observados x previstos	35
Gráfico 5 - Gráfico de superfície em 3D	36
Gráfico 6 - Gráfico de contorno gerado pelo modelo matemático	37
Gráfico 7 - Cinética dos experimentos nas condições padrão e otimizada	38
Gráfico 8 - Gráfico do consumo de oxigênio	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultivo utilizados para cultivo de rizóbios	15
Tabela 2 - Dimensões padrão do biorreator	21
Tabela 3 - Dimensões e parâmetros biorreator de 2,5 L	26
Tabela 4 - DCCR gerado pelo programa Statistica	29
Tabela 5 - Valores de K_La obtidos com método numérico utilizando diferentes combinações de tipos de pás	32
Tabela 6 - Resultado DCCR.....	33
Tabela 7 - Resultados gerados pela análise ANOVA.....	33
Tabela 8 - Cinética dos experimentos nas condições padrão e otimizada.....	37
Tabela 9 - Cinética	38

LISTA DE SIGLAS

DCCR	Delimitação Composto Central Rotacional
KLa	Coefficiente de transferência de oxigênio
OTR	Taxa de transferência de oxigênio
OUR	Taxa de consumo de oxigênio
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Rotações por minuto
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Vtip	Velocidade terminal no impelidor
VVM	Volume por volume de meio de cultivo

LISTA DE ACRÔNIMOS

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.1.1	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	13
3.2	Produção inoculantes	14
3.3	Transferência de oxigênio	16
3.3.1	Importância.....	16
3.3.2	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio KLa	16
3.3.3	Métodos de determinação do KLa.....	17
3.4	Estrutura padrão de um biorreator	20
3.4.1	Dimensões	20
3.4.2	Chicanas	22
3.4.3	Difusores de ar	22
3.4.4	Impelidores.....	22
4	METODOLOGIA	26
4.1	Scale down	26
4.2	Determinação do KLa	27
4.3	Otimização KLa	28
4.4	Fermentação <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	29
4.4.1	Determinação do q_{O_2} do <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Determinação do KLa	31
5.2	Otimização KLa	33
5.3	Fermentação <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	37
5.3.1	Determinação do q_{O_2} do <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	39
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos o crescimento do mercado inoculantes foi de 360%, demonstrando a adesão dos agricultores a estes insumos. A principal cultura que utiliza os inoculantes é a da soja, pois se trata de uma espécie exótica no Brasil e os solos contêm uma pequena quantidade destes microrganismos necessários para fixação biológica do nitrogênio para estas leguminosas (ARAUJO; CASTRO, 2019).

A empresa de consultoria SPARK fez o levantamento que a cada ano a taxa de agricultores que utilizam inoculantes aumenta em 6%. Os estados que mais consomem esse produto são Piauí, Maranhão, Tocantins, Bahia e Rondônia com um índice superior a 90% e os demais estados brasileiros ficaram entre 70% a 90% (ARAUJO; CASTRO, 2019).

Estes dados de mercado mostram a importância em melhorar a eficiência e produtividade dos inoculantes. Os microrganismos utilizados como inoculantes na cultura de soja são os *Bradyrhizobium spp.*, microrganismos aeróbios com a capacidade de realizar a fixação do nitrogênio quando associados a plantas da família Fabaceae (GIONGO; PASSAGLIA; ZANETTINI, 2007).

A produção industrial dos inoculantes é realizada em biorreatores agitados e aerados, sendo comercializado seguindo as normas estabelecidas pelo MAPA. O produto final pode apresentar diferentes formulações, sendo as mais comuns a líquida com adição de estabilizantes e a sólida onde o inoculante é adicionado a turfa estéril (SILVA JUNIOR *et al.*, 2019).

A melhoria na eficiência e produtividade da produção de *Bradyrhizobium spp.* geralmente é feita alterando/otimizando o meio de cultivo e alterando/otimizando parâmetros do processo como temperatura, agitação, pH e aeração. Pouca atenção, porém, tem sido dada ao projeto do biorreator.

A transferência de oxigênio para o meio de cultivo é um fator tradicionalmente limitante em bioprocessos e exige atenção no projeto do biorreator (geometria) e na escolha de seus componentes (tipo, número e tamanho dos impelidores, velocidade de agitação, tipo de dispersor e vazão de ar, entre outras), garantindo uma boa transferência de oxigênio para o meio de cultivo para que a concentração do oxigênio dissolvido sempre esteja superior a concentração crítica de oxigênio do microrganismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes impelidores na capacidade de transferência de oxigênio em um biorreator de bancada e seus efeitos na produção da bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia para medição do Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa);
- Avaliar o impacto da utilização de diferentes impelidores no KLa;
- Determinar o OUR para bactéria *Bradyrhizobium japonicum*;
- Identificar o melhor conjunto para o cultivo de *Bradyrhizobium japonicum*;
- Comparar a cinética de crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* utilizando impelidores tradicionais e o conjunto identificado no item anterior.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Bradyrhizobium spp.*

Rizóbios são bactérias encontradas naturalmente no solo, com capacidade de realizar a fixação do nitrogênio atmosférico quando estão associadas a plantas da Família Fabaceae. Esta é uma associação simbiótica onde a planta tem papel de fornecer O² e nutrientes, e as bactérias de fornecer o nitrogênio através da fixação biológica do nitrogênio. Estes rizóbios são quimiorganotróficos, aeróbios estritos, gram-negativos, não formam esporos e possuem forma de bastonetes com flagelos variando de um, dois ou seis flagelos peritríquios (GIONGO; PASSAGLIA; ZANETTINI, 2007).

Inicialmente os rizóbios foram classificados em um único gênero *Rhizobium*, em 1982 Jordan sugeriu uma classificação taxionômica se baseando na diferença nas velocidades de multiplicação, sendo *Rhizobium* para os rizóbios de multiplicação rápida e *Bradyrhizobium* para aqueles de multiplicação lenta. Este termo rizóbios que antigamente era utilizado para referenciar as bactérias do gênero *Rhizobium*, hoje é usado para todas as bactérias com a capacidade de formar nódulos e realizar a fixação biológica do nitrogênio quando associados a uma leguminosa (GIONGO; PASSAGLIA; ZANETTINI, 2007).

Os rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* possuem grande importância agronômica, pois eles são responsáveis por fixar nitrogênio atmosférico quando estão em simbiose com leguminosas, em especial a soja *Glycine max* (SOUSA, 2011). Em 2011 entre os inoculantes produzidos 99% eram destinados para a soja, sendo compostos pelos microrganismos *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. As *Bradyrhizobium* são caracterizadas por serem bactérias capazes de alcalinizar o meio 79 com azul de bromotimol, por sua viscosidade que varia em cada espécie e sua capacidade de formar nódulos nas raízes da soja. A forma de diferenciar as espécies é principalmente pela viscosidade observada nas colônias em placas de petri, sendo a *Bradyrhizobium japonicum* mais viscosa e a *Bradyrhizobium elkanii* com um aspecto aquoso, na eficiência em fixar nitrogênio, resistência a antibióticos, competitividade de nodulação e na produção de exopolissacarídeos (BARBOSA, 2014).

3.2 Produção inoculantes

A produção e comercialização de inoculantes no Brasil é feita por diversas empresas, seguindo as normas estabelecidas pelo MAPA. Estes inoculantes podem ser vendidos em diferentes formulações, as mais comuns são líquidas com estabilizantes e a sólida onde o inoculante é adicionado a turfa (SILVA JUNIOR *et al.*, 2019).

A formulação sólida é feita através da mistura da turfa com seu pH ajustado para neutralidade com a cultura líquida de rizóbios, sendo três partes de turfa para uma de cultura líquida (SOUSA, 2011). Esta turfa é uma substância originada da decomposição de restos vegetais, sendo encontrada em margens e regiões alagadiças de rios (SOUSA, 2011). Para a melhor eficiência e para estar de acordo com as normas do MAPA, esta turfa deve estar em forma de pó e ser esterilizada, por radiação gama ^{60}Co , previamente da mistura com o inoculante (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entre as formulações uma das mais utilizadas é a líquida, que consiste no caldo fermentado com alta densidade celular. Na formulação líquida é adicionado biopolímeros que tem as funções de: proporcionar melhor aderência do produto à semente; estabilizar o produto; inativar toxinas solúveis de revestimento de sementes; aumentar a sobrevivência de rizóbios durante o armazenamento e após a exposição a condições ambientais. Os biopolímeros mais utilizados são goma xantana, goma arábica e polivinilpirrolidona (PVP). As formulações líquidas são facilmente adquiridas e de fácil aplicação para pequenos produtores rurais (SCHUH, 2005). O ponto negativo é seu menor prazo de validade comparado ao meio sólido.

Os processos industriais de inoculantes são feitos em etapas. Primeiramente o crescimento inicial é feito em Erlenmeyer de 250 mL (cultura starter), que é utilizado como inóculo para galões de 10L, que são inoculados em biorreatores de escala industrial. Para ocorrer a produção da biomassa, é necessário que o meio de cultivo forneça os substratos essenciais para o microrganismo. Quanto mais o meio de cultivo atender os requisitos nutricionais do microrganismo, melhor (e mais rápida) será sua produção. Os meios descritos para *Bradyrhizobium* estão apresentados na tabela 1. Recomenda-se adicionar uma solução de micronutrientes, como a Zabriskie ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g.L⁻¹, CaCl_2 0,55 g.L⁻¹, MnCl_2 0,5 g.L⁻¹, FeSO_4 g.L⁻¹, $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g.L⁻¹, CuSO_4 0,16 g.L⁻¹ e CoCl_2 0,16 g.L⁻¹), por exemplo.

Tabela 1 - Meios de cultivo utilizados para cultivo de rizóbios

YM (Vicent, 1970)		Lopreto, Mazza e Balatti(1972)		Lorda e Balatti(1996)	
Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹
Manitol	10g	C ₃ H ₈ O ₃	10 g	Glicerol	10 g
Extrato de levedura	0,4g	Extrato de levedura	4 g	Extrato de levedura	4 g
K ₂ HPO ₄ 10%	1 mL	K ₂ HPO ₄	0,5 g	--	
KH ₂ PO ₄ 10%	4 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O 10%	2 mL	NaCl	0,1 g	NaCl	0,1 g
NaCl 10%	1 mL	KNO ₃	0,8 g	KNO ₃	0,8 g
Azul de Bromotimol em KOH 0,2 N 5%	5 mL	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g
--		FeCl ₃ a 10%	0,1 mL	FeCl ₃ a 10%	0,06 mL
--		MnSO ₄ a 10%	0,1 mL	MnSO ₄ a 10%	0,06 mL
pH	6,8	pH	6,8	pH	

Fonte: Adaptado de SOUZA (2011).

A produção industrial segue o formato de cultivo descontínuo (batelada), o qual consiste em duas etapas: esterilização do meio de cultivo e a inoculação em seguida. Ela é a mais utilizada em escala industriais pois apresenta um melhor controle de contaminação. A batelada é realizada em biorreatores, os quais podem monitorar e controlar os parâmetros: de aeração, agitação, temperatura e pH. Nestes biorreatores o processo de esterilização ocorre após o meio de cultivo ser adicionado, utilizando vapor quente que passa em um sistema de camisa do biorreator, garantindo à manutenção do meio de cultivo em 121°C por 15-30 minutos para biorreatores de até 200L (SOUSA, 2011).

3.3 Transferência de oxigênio

3.3.1 Importância

A transferência de oxigênio é um fator importante na produção do *Bradyrhizobium sp.*, pois, ele é um microrganismo aeróbio restrito e necessita do oxigênio dissolvido no meio para seu crescimento. No entanto segundo Schmidell e outros (2001), o oxigênio é pouco solúvel em água, sendo que a concentração de oxigênio dissolvido na saturação é de 7 mgO₂.L⁻¹, (a 1 atm e a 35 °C). Ao mesmo tempo, a velocidade de consumo pelos microrganismos é alta, sendo necessário manter o contínuo fornecimento de ar. Por isso é muito importante o controle e otimização na transferência de oxigênio para o meio de cultivo.

3.3.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio K_La

O processo de transferência do oxigênio desde a fase gasosa até a célula do microrganismo é composto por uma série de etapas de transferência de massa. A etapa considerada crítica é a transferência do oxigênio da bolha de ar estagnada envolta por uma película líquida (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

O termo OTR é a resistência à transferência de massa entre a película líquida e a bolha de ar. Este termo pode ser calculado através da equação 1.

$$OTR = K_L a, (C^* - C) \quad (1)$$

O termo C* é a concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio do líquido em uma determinada temperatura. C é a concentração de oxigênio dissolvido no meio do líquido. K_L é o coeficiente de transferência e a a área da interface gás-líquido. Como a obtenção do valor isolado do K_L é complexa costuma-se agregar os termos em um único parâmetro K_La, sendo ele denominado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. O K_La é um fator fundamental para bioprocessos aeróbios, pois através dele é possível estabelecer a eficiência da aeração e quantificar seu efeito e o efeito das variáveis na transferência de oxigênio para o meio.

O balanço de massa do oxigênio dissolvido na fase líquida é representado pela equação 2:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (2)$$

- C = Concentração de oxigênio dissolvido g.L^{-1} .
- OTR = Taxa de transferência de oxigênio $\text{g.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.
- OUR = Taxa de consumo do oxigênio $\text{g.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

O termo OUR é a taxa de consumo do oxigênio dissolvido pelo microrganismo e pode ser representada pela equação 3.

$$OUR = q_{O_2} * X \quad (3)$$

Sendo o q_{O_2} a taxa específica de consumo de oxigênio para cada microrganismo. Esta taxa varia durante o tempo sendo o valor máximo durante a fase log, mas é considerada constante para os cálculos. O X é a concentração celular.

3.3.3 Métodos de determinação do KLa .

O KLa pode ser obtido tanto em processos sem consumo de oxigênio quanto em bioprocessos que tem a presença de microrganismos consumidores de oxigênio. Os métodos de determinação podem ser divididos em químico e físicos. As duas principais metodologias aplicadas são análise da fase gasosa e o método dinâmico.

A análise da fase gasosa é feita através do balanço de massa do sistema. É utilizado analisador de oxigênio para medir a concentração dele na entrada do biorreator, na saída e na fase líquida. A fórmula 4 apresenta o balanço de massa do sistema:

$$KLa = \frac{F_{O_2}^{in} - F_{O_2}^{out}}{V(C^* - C)} \quad (4)$$

- $F_{O_2}^{in}$ = Vazão de entrada.
- $F_{O_2}^{out}$ = Vazão de saída.

- V = volume do biorreator.

Esse método apresenta algumas limitações e requerimentos. Especialmente o OUR precisa ser alto, pois garante uma diferença detectável entre o valor da concentração de oxigênio de entrada e saída.

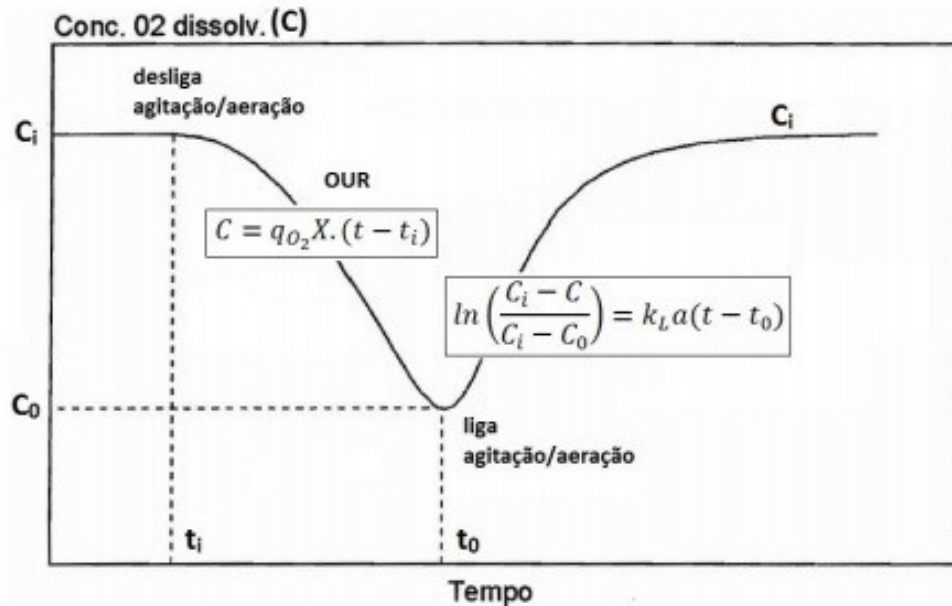
O método dinâmico é o mais utilizado para determinação do Kla durante um cultivo devido a sua simplicidade e reprodutibilidade. Este método assume que a taxa de consumo de oxigênio não é alterada pela ausência de aeração, agitação do meio e pela diminuição do oxigênio dissolvido. E foi descrito por Bandyopadhyay e Humphrey em 1967. Ele consiste em interromper a agitação e aeração na fase do cultivo que se deseja obter o Kla . Esta interrupção é temporária e deve ser curta para não interferir no processo. Durante esse processo o oxigênio dissolvido é monitorado por um eletrodo imerso dentro do biorreator. A concentração de oxigênio cai linearmente durante essa interrupção devido à respiração celular do microrganismo e é utilizada para obter o OUR (coeficiente angular da reta formada pela concentração celular versus tempo) (Figura 1).

Quando a agitação e aeração são ligadas, a concentração de oxigênio volta a subir. Esta subida não é de forma linear (Figura 1), nesta fase é determinado o valor do Kla através da equação 5.

$$\ln\left(\frac{C_i - C}{C_i - C_0}\right) = KLa(t - t_0) \quad (5)$$

A equação 5 é o balanço material do sistema durante a subida da concentração de oxigênio, onde o valor de C_i é a concentração antes da interrupção do sistema de agitação e aeração, C_0 concentração no momento que o sistema é ligado e o C é a concentração em um tempo t .

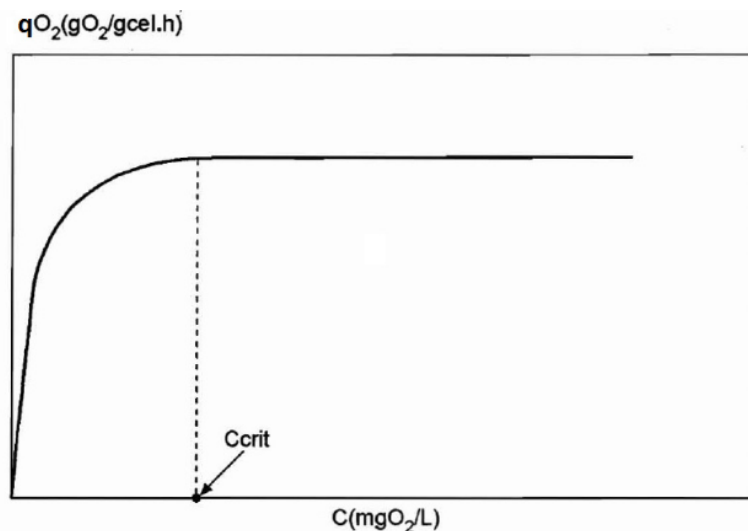
Figura 1 – Determinação do q_{O_2} e K_La a partir do método dinâmico



Fonte: Adaptado de Schmidell *et al.* (2001).

Este método apresenta algumas limitações. A decantação celular acontece quando é interrompido a agitação do sistema, isso gera um consumo de oxigênio mais intenso no fundo do biorreator, influenciando na leitura do sensor. A fim de resolver esta limitação Pouliot e outros (2000) sugerem não interromper a agitação por completo, mantendo-a leve (em torno de 30). A concentração de oxigênio dissolvido não deve chegar a ser inferior a concentração crítica para o microrganismo, pois quando isto ocorre o valor de q_{O_2} não é mais constante como é representado na figura 2.

Figura 2 - Gráfico da concentração de oxigênio dissolvido por q_{O_2}



Fonte: Adaptado de Schmidell *et al.* (2001).

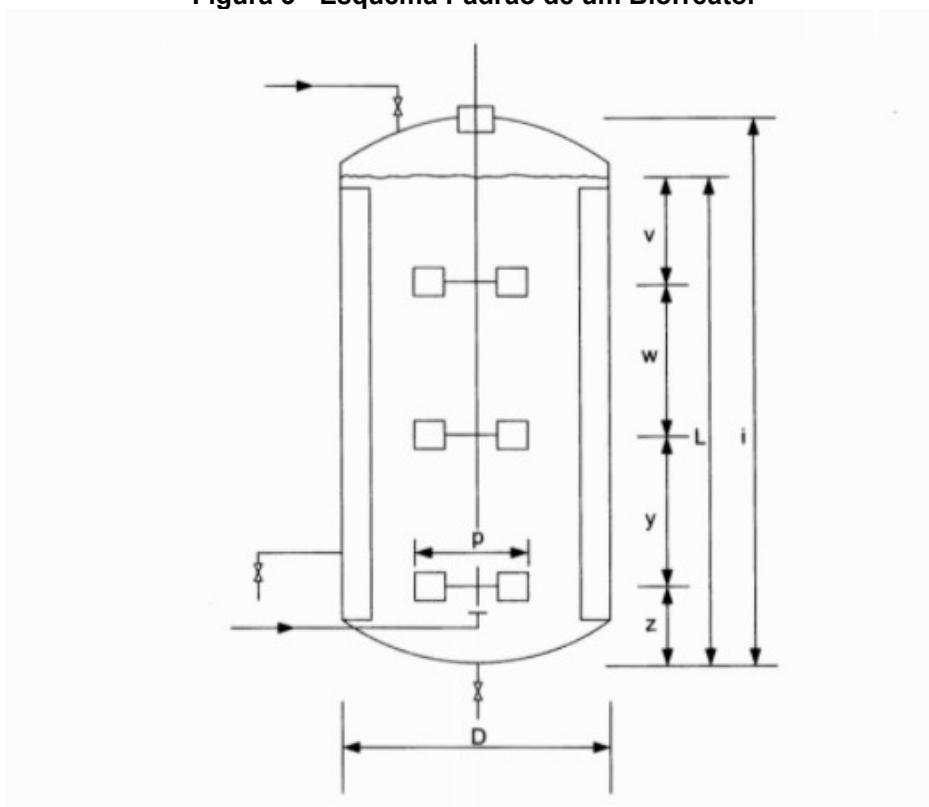
3.4 Estrutura padrão de um biorreator

3.4.1 Dimensões

O biorreator deve fornecer condições ambientais favoráveis para o crescimento microbiano, para isto ele necessita de uma série de parâmetros para seu projeto e construção. O biorreator deve ter a capacidade de ser esterilizado e se manter estéril por muitos dias, satisfazer as exigências legislativas de contenção ambiental, satisfazer as exigências metabólicas do microrganismo, manter a integridade física dos microrganismos, possuir um sistema de controle eficiente para temperatura e pH, um sistema para coleta asséptica à prova de contaminação do biorreator e da amostras, sistema para reduzir perdas por evaporação, sistema de controle da saída de gases do biorreator, o biorreator precisa ter superfícies internas polidas e todas as suas conexões devem ser soldadas ao invés de usar roscas ou flanges, manter suas dimensões similares a biorreatores maiores e menores (SCHMIDELL *et al.*, 2001) .

O biorreator mais comum em bioprocessos é o baseado no modelo de tanque cilíndrico vertical, com agitação mecânica e provido de um sistema de aquecimento e resfriamento e outros controles necessários ao bioprocessos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Figura 3 - Esquema Padrão de um Biorreator



Fonte: (Schmidell *et al.* 2001).

- D = Diâmetro do tanque.
- P = Diâmetro impelidor.
- Z = Altura do fundo do tanque até o primeiro impelidor.
- Y, W, V = Distância entre os impelidores.
- L = Altura do fundo até superfície do líquido.
- I = Altura do tanque;
- Db = Largura chicana.

Tabela 2 - Dimensões padrão do biorreator

(continua)

Dimensões	Steel e Maxon (1961)	Blakeborough (1967)	Paca <i>et al</i> (1976)	Aiba <i>et al</i> (1973)
L	55 cm	-	150 c	-
L / D	0,73	1 – 1,5	1,7	-
P / D	0,40	0,33	0,33	0,4
Db / D	0,10	0,08 – 0,010	0,098	0,095
Z / D	-	0,33	0,37	0,24

Tabela 2 - Dimensões padrão do biorreator

Dimensões	(conclusão)			
	Steel e Maxon (1961)	Blakeborough (1967)	Paca <i>et al</i> (1976)	Aiba <i>et al</i> (1973)
P / V	-	-	0,74	-
P / W	-	-	0,77	0,85
P / Y	-	-	0,77	0,85
P / Z	-	-	0,91	2,10
H / D	-	-	2,95	2,2

Fonte: Adaptado de (Schmidell *et al.* 2001).

3.4.2 Chicanas

Chicanas ou quebra-vórtice são utilizados em bioprocessos para aumentar a turbulência e oxigenação do meio em biorreatores agitados mecanicamente. Normalmente são 4 chicanas equidistantes entre elas. A sua largura é normalmente 10 % do diâmetro do biorreator. A sua instalação deve ser feita com alguns cuidados para evitar zonas de estagnação, para isto ela não deve ser soldada diretamente ao corpo do biorreator a sua fixação deve ser feita com suportes que deixem um espaço entre o corpo do biorreator e a chicana de 1 a 2 cm (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.4.3 Difusores de ar

Para suprir a demanda de ar do biorreator são utilizados difusores ou dispersores de ar, existem diversos modelos em forma de Y, tubo aberto simples e forma de anel o mais utilizado em biorreatores agitados sendo estes fixados logo abaixo do último impelidor. Os dispersores com formato de anel apresentam uma desvantagem, é necessária uma manutenção constante, pois eles podem entupir com facilidade quando os meios possuem grande quantidade de matéria prima em suspensão (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.4.4 Impelidores

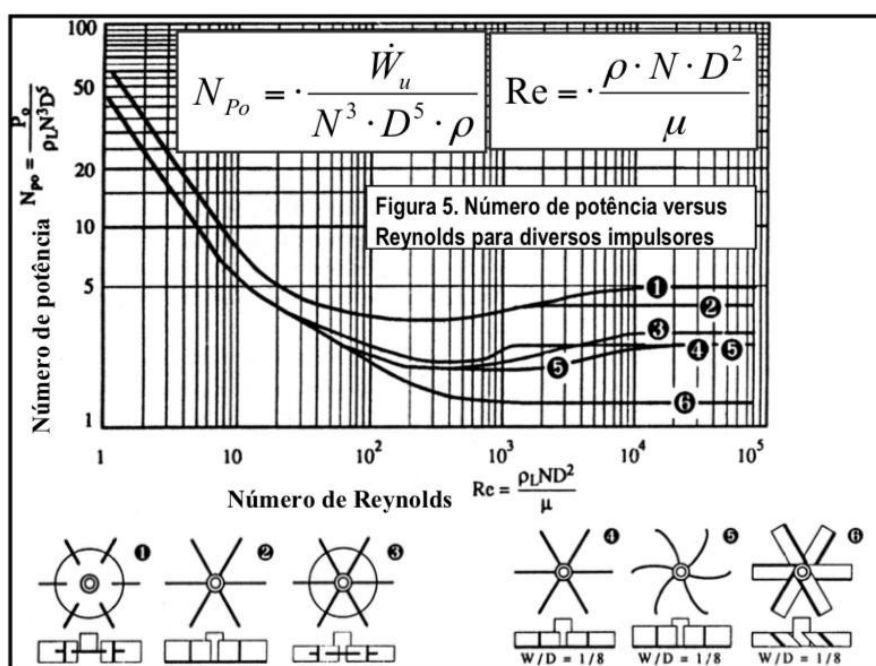
Os impelidores apresentam múltiplas funções nos biorreatores agitados,

homogeneização de meios com sólidos suspensos, transferência de oxigênio, transferência de calor e manter a uniformidade do meio durante a fermentação (LORENZINI, 2012).

O principal fator utilizado para projetar impelidores em biorreatores aeróbios é a transferência de oxigênio. A combinação do modelo impelidor e dispersor de oxigênio é a responsável pela eficiência na transferência de oxigênio para o meio de cultivo.

Os impelidores podem ser classificados de acordo com o regime de mistura, laminar ou turbulento. Para os de regime laminar o seu diâmetro é próximo ao diâmetro do tanque, devido que a transferência de torque para regime laminar é pobre. Já no regime turbulento esta transferência de torque é boa, para o líquido estar em regime turbulento o número de Reynolds deve ser superior que 10^3 variando para cada modelo de impelidor, normalmente o diâmetro do impelidor nesses casos varia de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ do diâmetro do biorreator (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Para bioprocessos é necessário que o regime esteja turbulento para uma transferência de massa e homogeneização mais eficientes. Além da classificação do regime eles são classificados em relação ao fluxo de escoamento, axial, radial ou misto.

Figura 4 - Gráfico número de Reynolds x número de potência

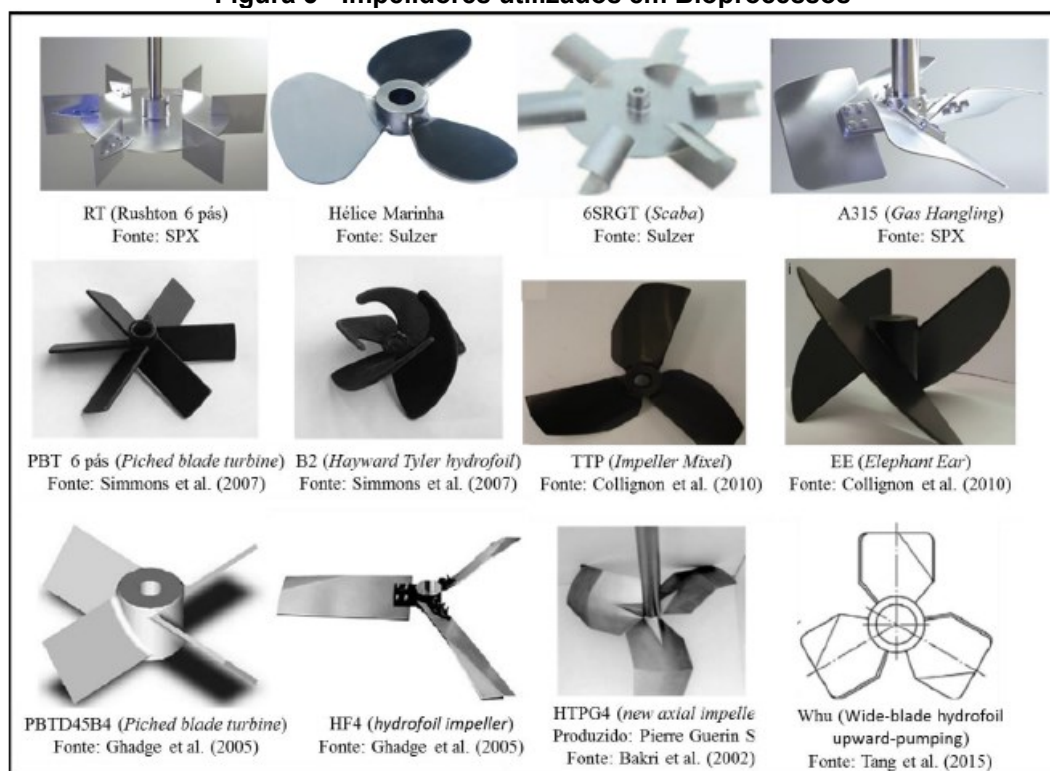


Fonte: (Schmidell *et al.* 2001).

Na figura 4 pode-se observar que o impelidor 1 turbina Rushton apresenta o maior valor do número de potência quando está em regime turbulento, levando a um alto consumo de potência. Este é o impelidor tradicional para biorreatores pois ele apresenta uma boa transferência de oxigênio para o meio, porém apresenta pontos negativos devido à alta taxa de cisalhamento próximo as pás e geração de mistura não uniforme (BUFFO *et al.*, 2015).

Na figura 5 apresenta outros modelos impelidores utilizados em biorreatores agitados. Cada um deles possui características diferentes em relação ao tipo de escoamento gerado, taxa de cisalhamento e capacidade de mistura. Os modelos orelha de elefante “EE” e pás inclinadas apresentam uma transferência de oxigênio menor comparado com o impelidor tipo Rushton, mas a taxa de cisalhamento e consumo de potência são menores e a eficiência de mistura é melhor (BUFFO *et al.*, 2015). Esta taxa cisalhamento é muito importante para culturas mais sensíveis como os fungos filamentosos.

Figura 5 - Impelidores utilizados em Bioprocessos

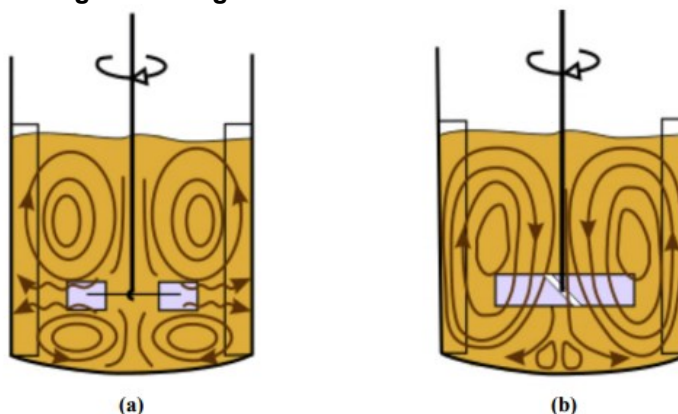


Fonte: (BUFFO *et al.*, 2015).

O escoamento radial se dá quando o fluxo do líquido é direcionado para as paredes do biorreator. Os impelidores que provocam esse escoamento geram regiões

de alta turbulência o que leva a quebra das bolhas de ar, melhorando a transferência de oxigênio. A figura 6 ilustra os regimes de escoamento radial e axial, sendo (a) radial e (b) axial. Os impelidores de escoamento radial possuem o efeito negativo de provocar altos valores de velocidade terminal no impelidor (V_{tip}), o que limita o uso desses impelidores para microrganismos resistentes a alta velocidade (BUFFO *et al.*, 2015). O escoamento axial se dá quando o fluxo do líquido é direcionado para o topo ou base do biorreator, essa direção depende da orientação do impelidor.

Figura 6 - Regime de escoamento radial e axial



Fonte: <https://www.thermopedia.com/content/549/>

4 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado em parceria com uma indústria que se localiza no Estado do Paraná.

4.1 Scale down

Foi realizado a análise de um dos biorreatores da indústria e os parâmetros de processo para se obter o valor teórico de comparação do KLa utilizando a equação 6, sendo α e β valores tabelados obtidos em (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$KLa = \left(\frac{Ni^{3,15} * Da^{2,5}}{Q^{0,5}} \right)^\alpha * \left(\frac{Q}{Da^2} \right)^\beta \quad (6)$$

Através deste dado foi realizado o scale down a fim de se obter o mesmo valor de KLa no biorreator de bancada da marca Technal modelo TEC-Bio-3,0V de 2,5L da UTFPR campus Ponta grossa. As medidas e parâmetros de processos utilizados no biorreator da UTFPR estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Dimensões e parâmetros biorreator de 2,5 L

(continua)

	Medidas	Unidades
Volume nominal	0,0025	m ³
Volume útil	0,002	m ³
Altura do tanque	233,7	mm
Altura do líquido	186,9	mm
Diâmetro do tanque	127,3	mm
Diâmetro do impelidor	43	mm
Largura da chicana	12,9	mm
Largura do impelidor	12	mm
Número de impelidores	2	-
Diâmetro Eixo	11,65	mm
P Potência motor	500	W

Tabela 4 - Dimensões e parâmetros biorreator de 2,5 L

(conclusão)

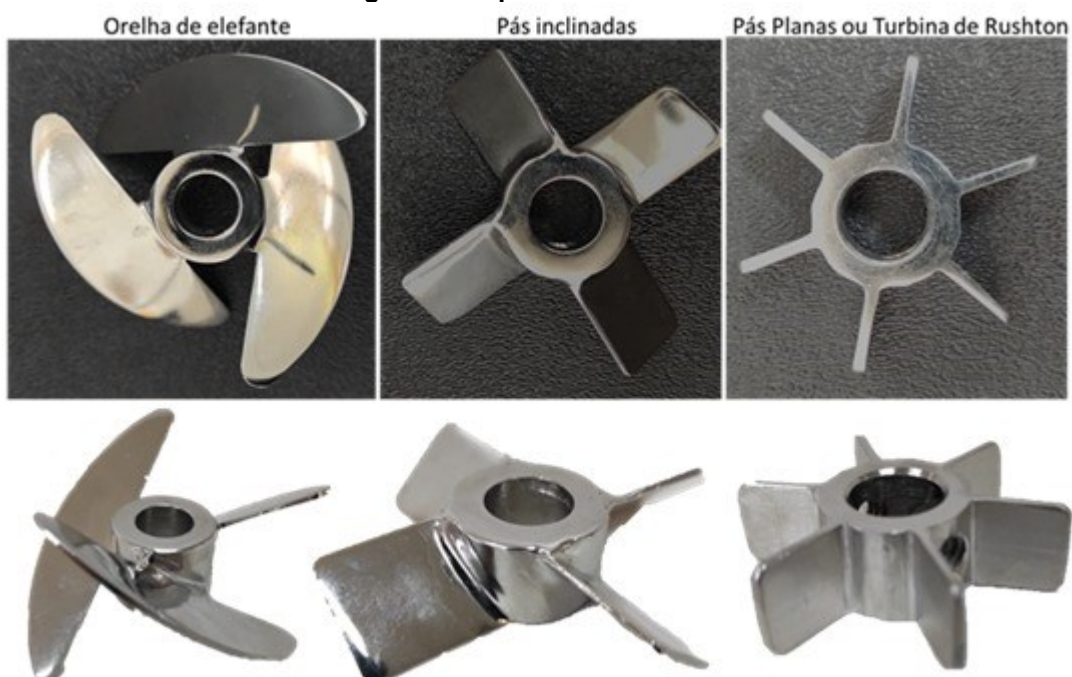
	Medidas	Unidades
Agitação	265	RPM
Distância entre os impelidores	36,0	mm
VVM	0,7	Lar.Lmeio ⁻¹ .min ⁻¹
T	30	°C

Fonte: Autoria própria (2021).

4.2 Determinação do KLa

Este teste foi realizado utilizando os impelidores disponíveis no laboratório de fermentações da UTFPR campus Ponta Grossa (figura 7). Os impelidores com fluxo axial, pás inclinadas e orelha de elefante, foram instalados na posição em que o seu regime de escoamento fosse descendente, devido a este regime apresentar melhor eficiência na transferência de oxigênio como foi observado por (BUFFO *et al.*, 2015).

Figura 7 - Impelidores utilizados



Fonte: Autoria própria (2021).

A determinação do KLa para diferentes impelidores foi realizada em água

destilada utilizando o método dinâmico sem a utilização de microrganismos proposto por (BANDYOPADHPAY; HUMPHREY, 1967), utilizando a vazão e agitação descritas na tabela 3. Primeiramente foi realizada a saturação do oxigênio dissolvido mantendo ligadas a aeração com ar comprimido e agitação, após a concentração de oxigênio ficar estável foi trocada a aeração com ar comprimido para aeração com CO₂ 96% para a remoção do O₂ dissolvido. Quando o valor de oxigênio dissolvido chegou em 30% foi trocado o sistema de aeração para com o ar comprimido novamente.

O cálculo do K_{La} foi realizado através dos dados gerados durante o experimento utilizando o método numérico dos mínimos quadrados através da ferramenta solver do software Excel, considerando a concentração máxima de oxigênio a 30°C de 7,57 mg/L segundo (LAMON, 2014).

As combinações utilizadas foram:

- Rushton + Rushton;
- Rushton + Pás inclinadas;
- Rushton + Orelha de elefante;
- Pás inclinadas + Pás inclinadas.

Nestas combinações o impelidor modelo Rushton foi instalado na parte inferior do eixo.

4.3 Otimização K_{La}

Com a combinação de impelidores que obteve um melhor K_{La}, Rushton + orelha de elefante, foi feito um planejamento experimental DCCR, delineamento composto central rotacional, utilizando o software Statistica versão teste de 30 dias.

Os valores utilizados de aeração e agitação para elaboração do DCCR foram obtidos através do scale down das condições máxima e mínima do biorreator industrial. Sendo o valor máximo para aeração de 1 Lar.Lmeio⁻¹.min⁻¹ e mínimo de 0,5 Lar.Lmeio⁻¹.min⁻¹ e para agitação o máximo de 289 RPM e mínimo de 233 RPM.

Este DCCR realizado foi 2² com 2 pontos centrais, sendo as variáveis independentes aeração e agitação e a variável dependente o K_{La}. O software gerou uma tabela apresentada na tabela 4 com 10 ensaios com os valores reais das variáveis independentes. Esses ensaios apresentados na tabela 4 foram executados

em água destilada utilizando o método dinâmico sem microrganismos.

Tabela 5 - DCCR gerado pelo programa Statistica

Ensaio	Aeração (Lar.Lmeio ⁻¹ .min ⁻¹)	Agitação (RPM)
1	0,5	233,0
2	0,5	289,0
3	1	233,0
4	1	289,0
5	0,346	265,0
6	1,053	265,0
7	0,7	225,0
8	0,7	305,0
9	0,7	265,0
10	0,7	265,0

Fonte: Autoria própria (2021).

Os valores da aeração dos ensaios 5 e 6 tiveram que ser arredondados devido a limitação do controlador de vazão de ar comprimido, o qual trabalha apenas com uma casa após a virgula.

4.4 Fermentação *Bradyrhizobium japonicum*

Foram realizadas duas fermentações no biorreator modelo TEC-Bio-3,0V. A primeira com o conjunto de impelidores tradicional em biorreatores, Rushton + Rushton, utilizando os parâmetros descritos na tabela 3. E a segunda fermentação utilizando a melhor condição obtida no DCCR, aeração de 1,1 Lar.Lmeio⁻¹.min⁻¹ e agitação de 289 RPM. O meio de cultivo e o inóculo utilizados foram cedidos pela indústria.

O biorreator foi montado e adicionado 2 litros de meio de cultivo, logo após foi esterilizado em autoclave a 121°C por 50 minutos junto aos materiais necessários para realizar a inoculação e coleta asséptica. A inoculação aconteceu após a temperatura do meio de cultivo estar em 30 °C, o volume de inóculo das SEMIA 5079 e SEMIA 5080 utilizado foi o necessário para que a concentração inicial estivesse aproximadamente em 1x10⁸. A fermentação durou 96 horas sendo que no tempo 0 e a cada 24 horas foi coletado uma alíquota de 20 mL de forma asséptica para realizar

a contagem de células viáveis, em triplicata, no fluxo laminar segundo a instrução normativa N°30 de 12 de novembro de 2010 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Através da contagem celular foi calculado o μ_{xmax} e tempo de geração das fermentações, o μ_{xmax} é calculado através da equação 7 utilizando o intervalo de tempo da fase logarítmica no crescimento celular.

Os valores de μ_x foram calculados através da equação número 7.

$$\mu_x = \ln \frac{(x_f - x_i)}{(t_f - t_i)} \quad (7)$$

- x_f : Número de células finais;
- x_i : Número de células iniciais;
- t_f : tempo final;
- t_i : tempo inicial.

Os valores de tempo de geração foram calculados através da equação número 8.

$$\text{Tempo de geração} = \text{Log}2 * \frac{(t_f - t_i)}{\text{Log}(x_f) - \text{Log}(x_i)} \quad (8)$$

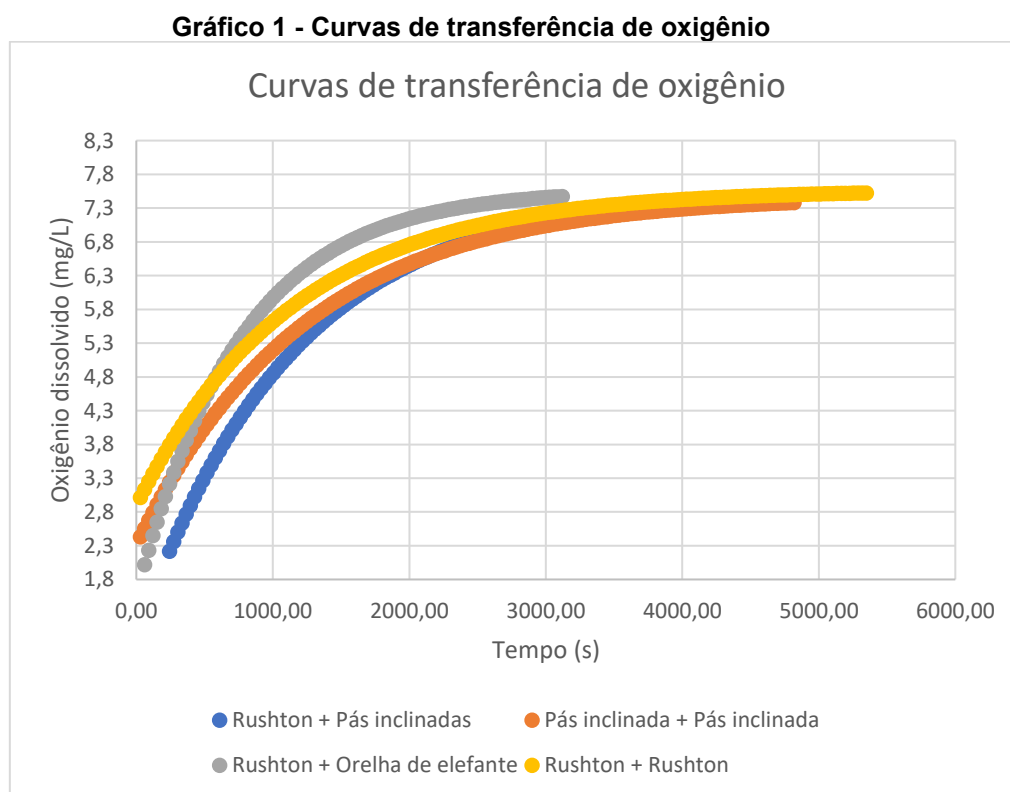
4.4.1 Determinação do q_{O_2} do *Bradyrhizobium japonicum*

Logo após o término das 96 horas de fermentação, a agitação e aeração foram desligadas para adicionar ao biorreator meio de cultivo até completar o volume inicial de 2 L para realizar o teste de consumo de O_2 do *Bradyrhizobium japonicum*. Com o volume ajustado novamente para 2 L foi religado agitação e aeração até estabilizar o valor de O_2 dissolvido. Após estabilizar o valor de O_2 dissolvido como sugerem Pouliot e outros (2000) foi desligado a aeração e agitação foi reduzida para 30 RPM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação do KLa

As curvas de transferência de oxigênio para cada combinação de impelidores obtidas no experimento realizado para determinar o KLa estão compiladas e apresentadas no gráfico 1. Analisando de forma qualitativa o gráfico 1, observando qual das curvas estabilizou a concentração de oxigênio em menor tempo, a combinação Rushton + orelha de elefante apresenta a melhor eficiência na transferência de oxigênio. Esta melhor eficiência na transferência de oxigênio é justificada pela união das características de cada impelidor (GRASSANO *et al.*, 2009). O impelidor modelo Rushton que fica mais próximo ao disco de aeração é eficiente na quebra das bolhas de ar, aumentando sua superfície de contato com o líquido, e o modelo orelha de elefante com regime de escoamento descendente aumenta a capacidade de mistura e o tempo de retenção da bolha de ar no líquido e (BUFFO *et al.*, 2015).



O gráfico 2 apresenta a curva experimental e a curva obtida através do método

numérico dos mínimos quadrados (tabela 5). As combinações que obtiveram os maiores valores KLa foram Rushton + pás inclinadas e Rushton + orelha de elefante, mostrando que utilizar um impelidor com escoamento radial próximo ao disco de aeração e um segundo impelidor com escoamento axial descendente resulta em uma melhor eficiência na transferência de oxigênio para o líquido. Estas combinações superam a eficiência do conjunto tradicionalmente utilizado em biorreatores comerciais (Rushton + Rushton).

Gráfico 2 - Curvas de transferência de oxigênio experimental e obtidas com método numérico



Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 6 - Valores de KLa obtidos com método numérico utilizando diferentes combinações de tipos de pás

Combinação de tipos de pás	$KLa(s^{-1})$
Rushton + Rushton	8,75E-04
Pás inclinadas + Pás inclinadas	8,19E-04
Rushton + Pás inclinadas	8,93E-04
Rushton + Orelha de elefante	1,32E-03

Fonte: Autoria própria (2021).

5.2 Otimização KLa

O resultado do experimento DCCR com os valores de KLa está apresentado na tabela 6. O ensaio que apresentou o melhor KLa com o valor de 0,0045155132 s⁻¹ foi o 6 utilizando 1,1 Lar.Lmeio⁻¹.min⁻¹ de aeração e 265 RPM de agitação. O R² do DCCR foi de 0,93818, significando que o modelo consegue prever o resultado gerado com a alteração da aeração e agitação em 93,82% dos casos.

Tabela 7 - Resultado DCCR

Ensaio	Aeração (Lar.Lmeio ⁻¹ .min ⁻¹)	Agitação (RPM)	KLa(s ⁻¹)
1	0,5	233,0	1,80E-03
2	0,5	289,0	2,54E-03
3	1	233,0	3,24E-03
4	1	289,0	4,02E-03
5	0,3	265,0	1,89E-03
6	1,1	265,0	4,52E-03
7	0,7	225,0	1,95E-03
8	0,7	305,0	2,26E-03
9	0,7	265,0	1,88E-03
10	0,7	265,0	1,84E-03

Fonte: Autoria própria (2021).

Através do software Statistica foi gerada a tabela do ANOVA (tabela 7). As variáveis consideradas significativas são aquelas que possuem p-valor <0,05, na tabela estão apresentadas em vermelho. Observa-se que a variável aeração é significativa tanto a linear quanto a quadrática, já agitação sua variável significativa é apenas a linear. Isto representa que a aeração possuiu uma maior influência na transferência de oxigênio neste experimento.

Tabela 8 - Resultados gerados pela análise ANOVA

(continua)

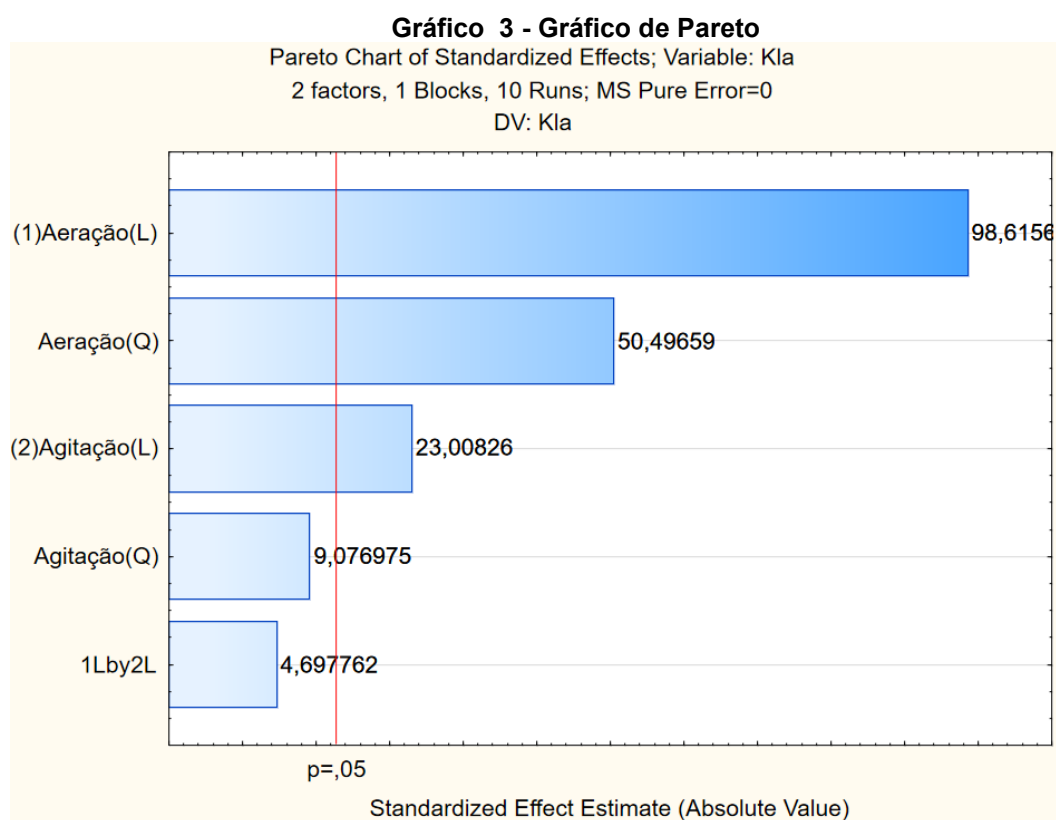
Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Aeração (L)	0,000007	1	0,000007	9725,050	0,006455
Aeração (Q)	0,000002	1	0,000002	2549,906	0,012606

Tabela 9 - Resultados gerados pela análise ANOVA

						(conclusão)
Fator	SS	df	MS	F		p
(2)Agitação(L)	0,000000	1	0,000000	529,380		0,027652
Agitação(Q)	0,000000	1	0,000000	82,391		0,069854
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	22,069		0,133523
Lack of Fit	0,000001	3	0,000000	252,518		0,046219
Pure Error	0,000000	1	0,000000			
Total SS	0,000009	9				

Fonte: Autoria própria (2021).

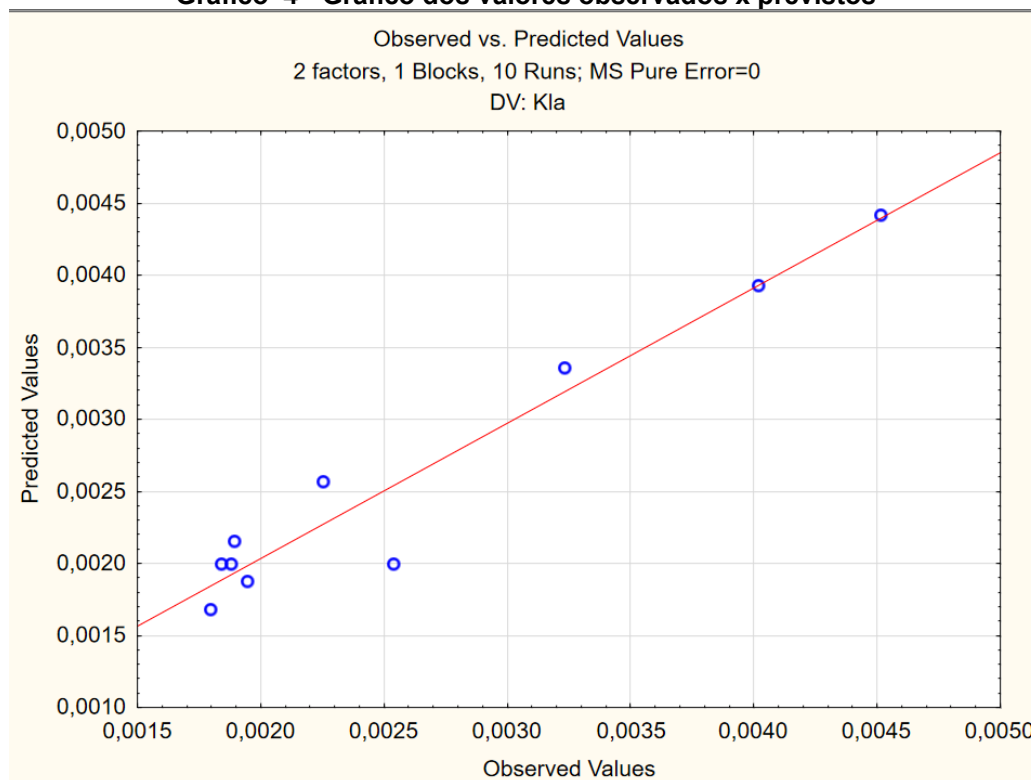
O gráfico de Pareto (gráfico 3) que como a tabela do ANOVA mostra as variáveis independentes e o seu p-valor em formato de barras, as barras que ultrapassam a linha vermelha que representa $p > 0,05$ são variáveis significativas. Neste gráfico observa-se também que a variável aeração possui uma maior influência na transferência de oxigênio para meio líquido.



Fonte:

Autoria própria (2021).

O gráfico 4 mostra a distribuição dos pontos experimentais em relação ao calculado pelo modelo matemático gerado pelo DCCR.

Gráfico 4 - Gráfico dos valores observados x previstos

Fonte: Autoria própria (2021).

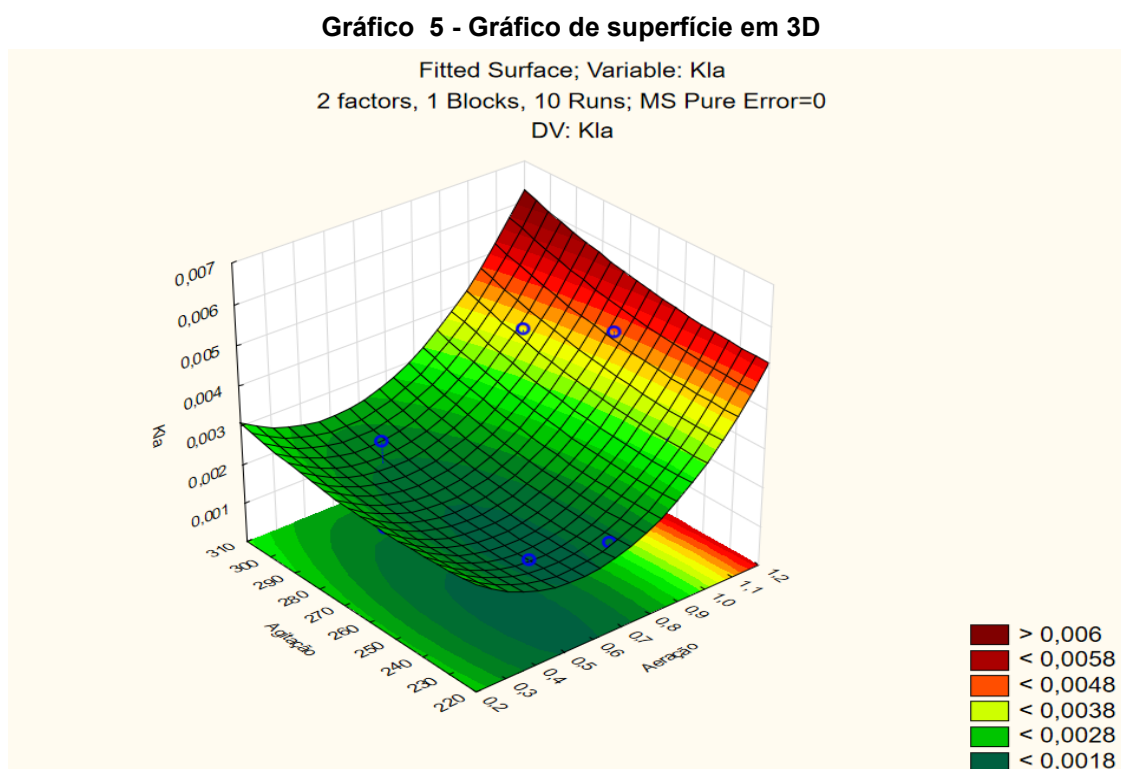
Os gráficos 5 e 6 apresentam as superfícies de respostas geradas através do DCCR, nelas podemos observar o valor esperado alterando as duas variáveis independentes. Observa-se que as duas variáveis são diretamente proporcionais com a transferência de oxigênio, pois com o aumento destas variáveis aumenta o valor previsto da resposta. Através destes resultados gerados pelo DCCR é possível prever quais são os valores de aeração e agitação que proporcionam uma melhor transferência de oxigênio. Estes valores sempre são os maiores possíveis, tanto aeração quanto agitação, porém tem que se avaliar qual é a capacidade máxima do biorreator e a do microrganismo de interesse.

Em escala industrial a velocidade de agitação é limitada devido aos motores utilizados, isso acontece porque os biorreatores industriais possuem grandes volumes de operação necessitando de motores grandes e com uma potência elevada para manter agitações elevadas, tornando inviável a utilização destes motores pelo seu valor elevado e alto consumo de energia. Desta forma o valor ótimo de agitação utilizado neste trabalho foi 289 RPM e aeração de $1.1 \text{ Lar.Lmeio}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Através do gráfico 5 foi gerado a equação que prediz o valor de KLa:

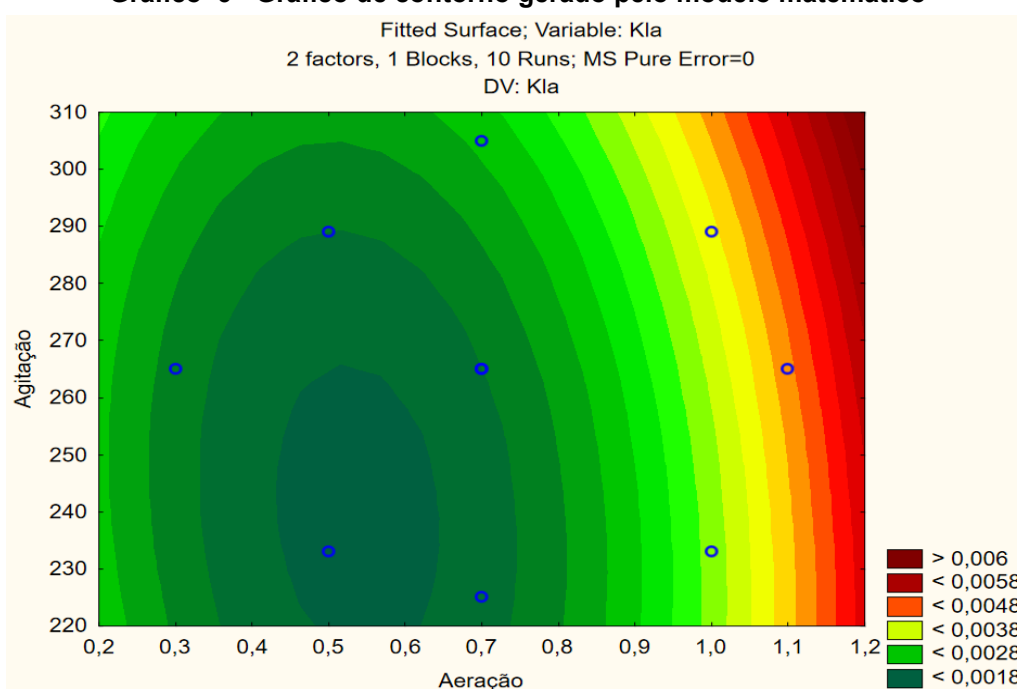
$$z = 0,013384406567038 - 0,010813942274811 * x + 0,0080683231792767 * x^2 + 0,000000143279962806 * y^2$$

- Z = KLa;
- X = Aeração;
- Y = Agitação.



Fonte: Autoria própria (2021).

Os gráficos 5 e 6 mostram também que o KLa tende a aumentar com o aumento da aeração e agitação, devido a este comportamento é interessante testar aerações e agitações com valores mais elevados em experimentos futuros. No gráfico 6 podemos observar que a condição 265 RPM de agitação e 0,5 VVM de aeração possui uma transferência de oxigênio pior que a condição 265 RPM de agitação e 0,2 VVM de aeração, isso vai contra o que foi observado no gráfico de Pareto. Então também é interessante em um experimento futuro testar até a aeração 0 VVM para obter o ponto mínimo no gráfico de superfície.

Gráfico 6 - Gráfico de contorno gerado pelo modelo matemático

Fonte: Autoria própria (2021).

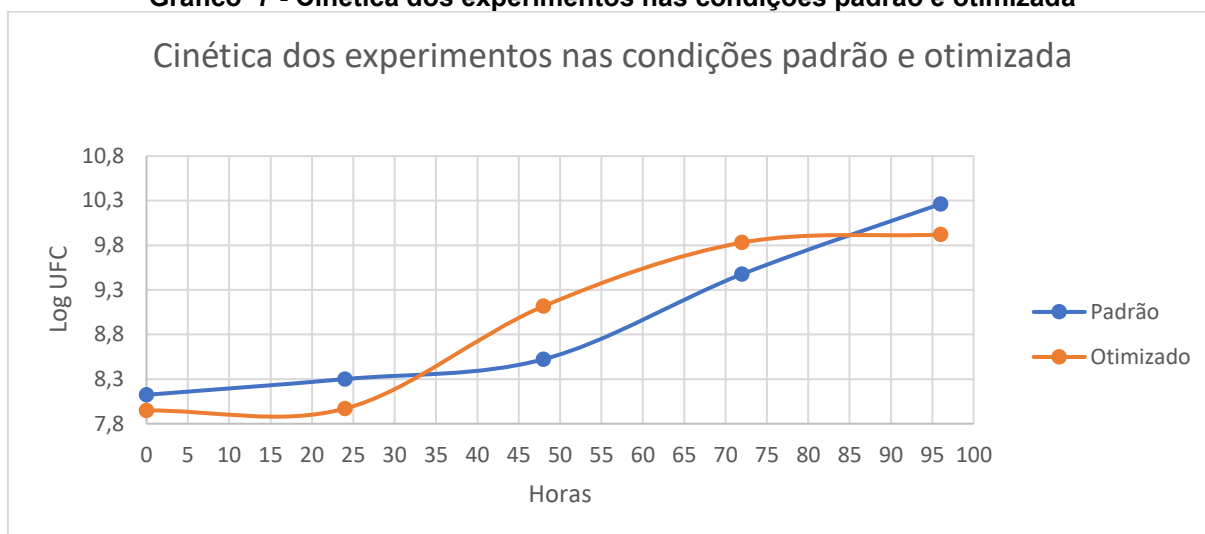
5.3 Fermentação *Bradyrhizobium japonicum*

O resultado médio das triplicatas da contagem de células viáveis durante as fermentações utilizando os parâmetros descritos na tabela 3 e os parâmetros otimizados obtidos no DCCR estão apresentadas na tabela 8 e no gráfico 7. Após 96 horas a concentração de células ficou em $1,83 \times 10^{10}$.

Tabela 10 - Cinética dos experimentos nas condições padrão e otimizada

Ensaio	Horas	UFC/mL	LOG UFC
Condição padrão	0	1,33E+08	8,1245
	24	2,00E+08	8,3006
	48	3,33E+08	8,5224
	72	3,00E+09	9,4766
	96	1,83E+10	10,2628
Combinação otimizada	0	8,88E+07	7,9484
	24	9,32E+07	7,9696
	48	1,31E+09	9,1172
	72	6,77E+09	9,8306
	96	8,33E+09	9,9203

Fonte: Autoria própria (2021).

Gráfico 7 - Cinética dos experimentos nas condições padrão e otimizada

Fonte: Autoria própria (2021).

A contagem de células viáveis durante a fermentação utilizando os parâmetros otimizados no DCCR e a combinação de impelidores, Rushton + orelha de elefante. A concentração de células viáveis após 96 horas ficou em $8,33 \times 10^9$.

Analisando os resultados da tabela 8 e do gráfico 7 observa-se que a otimização e troca de impelidores não apresentou grande impacto na fermentação. Inclusive um maior número de células ao final da fermentação foi observado utilizando condição padrão, porém esta fermentação também iniciou com uma concentração de células iniciais maior. Isso demonstra que a transferência de oxigênio não está sendo um fator limitante no processo.

A tabela 9 apresenta os valores de tempo de geração e μ_{\max} das fermentações, estes resultados mostram que houve um impacto positivo na fermentação com os parâmetros otimizados. No tempo de geração foi observado um ganho de 6,95% e 12,5% em relação ao μ_{\max} , estes resultados impactam na diminuição do tempo de produção industrial gerando uma maior produtividade durante o ano.

Tabela 11 - Cinética

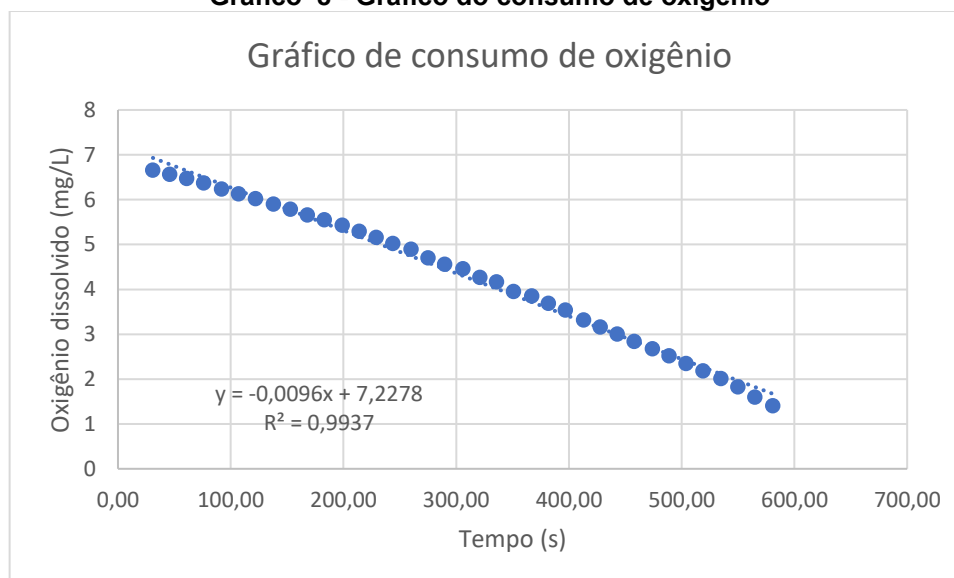
Teste	Tempo de geração (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)
Padrão	8,30	0,08
Otimizado	7,76	0,09

Fonte: Autoria própria (2021).

5.3.1 Determinação do qO_2 do *Bradyrhizobium japonicum*

Após o final de fermentação utilizando os parâmetros otimizados foi realizado o método dinâmico para determinar o qO_2 do *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080. O gráfico 7 apresenta a reta de consumo de oxigênio após a interrupção na aeração, a regressão linear apresentou um R^2 de 0,9937 e sua equação da reta $y = -0,0096x + 7,2278$. Como o consumo de oxigênio pelo microrganismo é representada pela equação $C = qO_2 * x(tf - ti)$ então o valor de $qO_2 * x$ é o coeficiente angular da equação da reta obtida através da regressão linear. Portanto o valor de $qO_2 * x(OUR)$ é de $0,0096 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, dividindo este valor pelo número de células viváveis durante o experimento encontramos o qO_2 da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* para as SEMIA 5079 e 5080: $1,47462E-15 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Gráfico 8 - Gráfico do consumo de oxigênio



Fonte: Autoria própria (2021).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos deste trabalho corroboram com a literatura indicando que a utilização de uma combinação de impelidores melhora a eficiência na transferência de oxigênio para o meio de cultivo em biorreatores, sendo a combinação mais eficiente para o biorreator estudado a que utiliza um impelidores com escoamento radial próximo ao disco de aeração e outro com escoamento axial descendente. O presente trabalho também concluiu durante a etapa de otimização que a aeração tem um maior impacto na transferência de oxigênio, este resultado é de grande importância, pois através dele pode ser realizado uma diminuição no gasto de energia elétrica em biorreatores industriais diminuindo a velocidade de agitação do biorreator.

Neste trabalho também foi determinado ineditamente pelo método dinâmico o valor de qO_2 , $1,47462E-15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, para a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080. Já a otimização na transferência de oxigênio gerou uma melhoria na produção de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080, aumentando seu μ_{max} em 12,5% e no tempo de geração em 6,95%, através desta melhoria o tempo de produção industrial é reduzido gerando um ganho de produtividade ao longo do ano.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S. C.; CASTRO, J. R. P. Consolidação de uma tecnologia vencedora. **Agroanalysis**, v. 39, n. 8, p. 27-28, 2019.

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 533-544, 1967.

BARBOSA, L. D. P. **Avaliação de métodos para controle de qualidade de inoculantes para soja**. Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira. 2014. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade federal de Lavras, Lavras, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2656>. Acesso em: 2 mai. 2021.

BUFFO, M. M. *et al.* Análise do consumo de potência e da transferência de oxigênio em tanque agitado com diferentes associações de impelidores utilizando fluido pseudoplástico. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1370-1377, 2015.

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.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 148f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GRASSANO, A. E. *et al.* Quantitative relationship between maximum growth rates and the intracellular pattern of α -esterase and β -esterase activity of leguminous infecting bacteria. **New biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 234-238, 2009.

LAMON, A. W. **Aplicação de microssensores no monitoramento de oxigênio dissolvido, potencial REDOX e temperatura em estudos limnológicos**. Orientador: José Roberto Campos. 2014. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-10102014-131806/pt-br.php>. Acesso em: 5 mai. 2021.

LORENZINI, G. C. **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de bacillus megaterium**. Orientador: Debora Jung Luvizetto Faccin. 2012. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/110108>. acesso em: 12 mai. 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução normativa Nº30. **Fertilizantes, corretivos, substratos e inoculantes arquivos**. 12 nov. 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/fertilizantes-substratos/INSTRUONORMATIVASDAN30DE12DENOEMBRODE2010.pdf/view>. Acesso em: 22 mar. 2021.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p

POULIOT, K. *et al.* KLa evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 565-573, 2000.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. Editora Blucher, 2001.

SCHUH, C. A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sa . 2005. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/7410>. Acesso em: 5 mai. 2021.

SILVA JUNIOR, J. J. *et al.* Impacto Econômico dos Inoculantes na Soja: Uma Análise Insumo-Produto. **Revista de Estudos Sociais**, v. 21, n. 42, p. 99-121, 2019.

SOUSA, P. M. **Otimização do processo de produção de células das estirpes de Bradyrhizobium INPA 3-11B e UFLA 3-84, inoculantes do feijão-caupi**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade federal de lavras.