



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Lipases por Cultivo em Estado Sólido em Biorreator de Leito Fixo em Escala Piloto

L. O. PITOL¹, M. T. SIEBERT², A. S. MACHADO³; A. T. J. FINKLER⁴, D. A. MITCHELL², N. KRIEGER³ e G. M. ZANIN¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química
Avenida Colombo, 5790 – Bloco E46 – Sala 09 – 87020-900 Maringá – PR - E-mail: luana.pitol@gmail.com

² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Caixa Postal 19046 – 81531-980 Curitiba – PR

³ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química
Caixa Postal 19081 – 81531-980 Curitiba – PR

⁴ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química
Caixa Postal 19011 – 81531-980 Curitiba – PR

RESUMO

O cultivo em estado sólido é uma alternativa economicamente atrativa ao cultivo submerso para a produção de lipases. No entanto, o aumento de escala do cultivo em estado sólido ainda enfrenta alguns desafios, devido a limitações na transferência de calor. No presente trabalho foi realizado um cultivo em biorreator de leito fixo em escala piloto. O biorreator foi carregado com 15 kg de substrato seco, que resultou em um leito com altura de 40 cm. Durante o cultivo, a produção de lipases, a temperatura do leito em diferentes alturas e a temperatura do ar de entrada e de saída foi monitorada continuamente. No final do cultivo, a uniformidade da produção de lipases foi avaliada. Não houve problemas de controle de temperatura do leito durante o cultivo e a atividade de hidrólise e esterificação obtida em escala piloto foi 43 e 86% da atividade obtida em escala de laboratório, respectivamente.

Palavras-chave: lipases, biodiesel, *Rhizopus microsporus*, cultivo em estado sólido, biorreator de leito fixo, aumento de escala

INTRODUÇÃO

A rota enzimática de produção de ésteres alquílicos apresenta vantagens potenciais em relação à rota química de síntese atualmente implantada na indústria do biodiesel, principalmente devido a um menor consumo de energia, à possibilidade de utilização de matérias-primas com elevados conteúdos de acidez e a produção de glicerol mais puro, além de ser menos impactante em termos ambientais (Véras *et al.*, 2011). No entanto, o desenvolvimento e a implantação do processo industrial utilizando lipases ainda são dificultados pelo elevado custo da enzima.

O cultivo em estado sólido (CES) tem o potencial de reduzir os custos de produção de lipases, pois possibilita a utilização de resíduos agroindustriais que são abundantes e de baixo custo. Além disso, o CES geralmente resulta em uma maior produtividade volumétrica, devido ao meio mais concentrado (Pandey *et al.*, 2000). Embora a produção de lipases por CES tenha sido extensivamente estudada em escala de laboratório nas últimas décadas, ainda



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

não há muitos trabalhos em maiores escalas para a produção destas enzimas. Os poucos trabalhos disponíveis na literatura não fornecem dados importantes para guiar o aumento de escala, tais como o perfil de temperatura, altura do leito e uniformidade da produção de enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

O biorreator consiste em um cilindro de aço inox AISI 306, onde o substrato fica sobre uma base retangular perfurada, com furos de 1 mm. O ar é injetado abaixo da base e flui no sentido do fundo para o topo do leito (Figura 1).

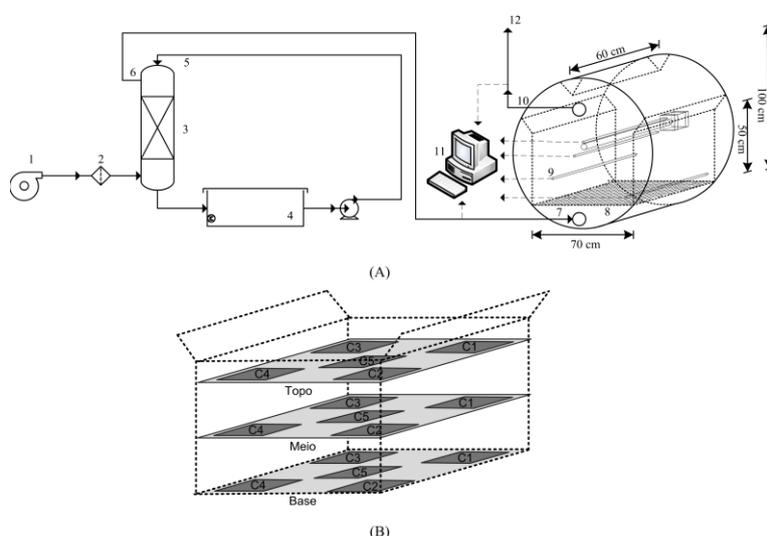


Figura 1. Representação esquemática do biorreator piloto (1) soprador de ar; (2) filtro de ar; (3) torre de umidificação; (4) reservatório de água; (5) água do reservatório; (6) ar saturado (7) entrada de ar; (8) base perfurada; (9) termopares ao longo do eixo vertical; (10) de saída de ar; (11) equipamento de aquisição de dados; (12) lavador de gases.

Foi utilizado *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM e 15 kg de substrato (massa seca), composto por 50% bagaço de cana e 50% farelo de trigo, que resultou em um leito com 40 cm de altura. O substrato foi autoclavado (121°C, 20 min) e umedecido com uma solução nutriente contendo 3,2 (% m m⁻¹, baseado em substrato seco total) de ureia até umidade de 60% (m m⁻¹, base úmida). O cultivo foi inoculado com uma suspensão de esporos, devendo-se obter uma concentração final de esporos no meio sólido de 3,15×10⁷ esporos g⁻¹ de substrato seco. O biorreator foi mantido sob agitação durante 30 min, para a homogeneização do meio de cultivo. Após este período, a superfície do leito foi nivelada utilizando um rastelo, e o biorreator foi então fechado e o sistema de umidificação e circulação do ar acionados. A temperatura do reservatório de água foi mantida a 36°C durante o cultivo. A vazão do ar foi mantida constante em 110 m³ h⁻¹, o que resultou em uma velocidade superficial do ar de 0,07 m s⁻¹.

As temperaturas em várias posições do leito e a temperatura do ar de entrada e saída foram monitoradas continuamente. Durante o cultivo, foram removidas amostras do topo do leito para a determinação da atividade de hidrólise e esterificação e ao final do cultivo foram coletadas amostras de diferentes posições e alturas do leito para verificar a homogeneidade da produção de lipases. A dosagem de atividade de hidrólise foi realizada utilizando o sólido



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

fermentado liofilizado diretamente no meio reacional, pelo método titulométrico em pHStat. A atividade de esterificação foi avaliada utilizando como reação-padrão a síntese do oleato de etila. O teor residual de ácidos graxos livres (AGLs) foi quantificado pelo método colorimétrico (Lowry e Tinsley, 1976). As atividades de hidrólise e esterificação foram expressas como unidades de atividade por grama de sólido fermentado seco ($U\ g^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O início do aparecimento da atividade de hidrólise ocorreu após 7 h de cultivo (Figura 2A). No intervalo de 7 a 20 h a atividade de hidrólise aumentou rapidamente e atingiu um valor máximo de $113\ U\ g^{-1}$ em 20 h, valor muito menor do que o encontrado em frascos Erlenmeyer e biorreator de colunas, que foram de $262\ U\ g^{-1}$ e $265\ U\ g^{-1}$ em 18 h, respectivamente. A partir de 20 h até o final do cultivo, a atividade diminuiu, chegando a $94\ U\ g^{-1}$ em 24 h. O mesmo perfil foi encontrado para a atividade de esterificação. No entanto, a máxima atividade de esterificação, $10,4\ U\ g^{-1}$ em 20 h, ficou próxima do valor de $12,3\ U\ g^{-1}$ encontrado em Erlenmeyer em 18 h e de $12,1\ U\ g^{-1}$ encontrado em 18 h em biorreator de colunas.

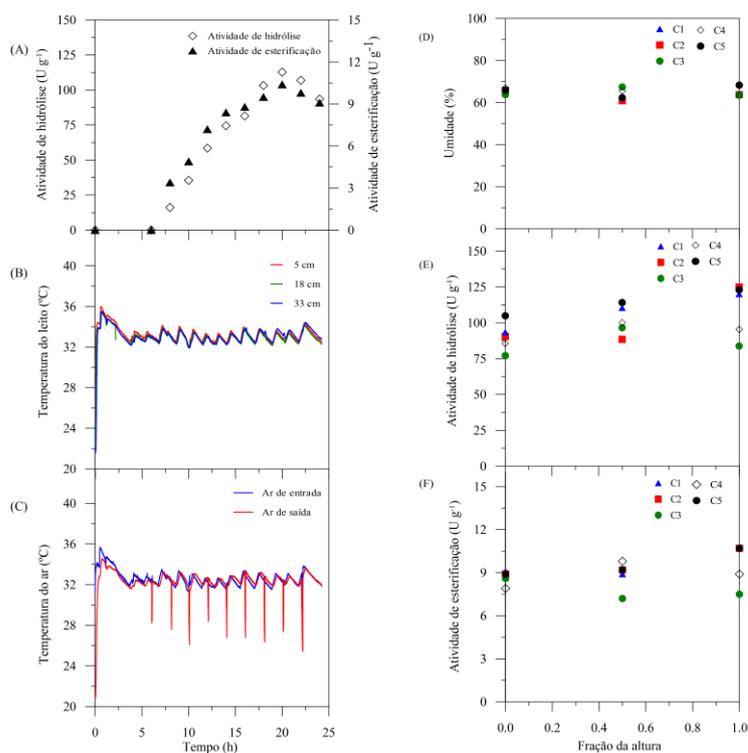


Figura 2. Perfis durante o cultivo em estado sólido com *Rhizopus microsporus* e mapeamento do leito no final do cultivo. (a) atividade de hidrólise e esterificação do sólido fermentado do topo do leito; (b) temperatura do leito nas alturas de 5, 18 e 33 cm; (c) temperatura do ar de entrada e saída; (d) umidade (base úmida) do sólido fermentado após 24 h em diferentes posições e alturas do leito; (e) atividade de hidrólise do sólido fermentado após 24 h em diferentes posições e alturas do leito; (f) atividade de esterificação do sólido fermentado após 24 h em diferentes posições e alturas do leito.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A temperatura do leito permaneceu em torno de 34°C durante todo o cultivo, não sendo observado um aumento da temperatura do leito (Figura 2B). O perfil temperatura do ar de entrada e saída ficou semelhante ao encontrado no leito, o que indica que não houve compactação (Figura 2C). A menor produção de calor metabólico de *R. microsporus* justifica a ausência de problemas de controle da temperatura do leito geralmente esperado em maiores escalas. Em biorreator de colunas, foi obtida uma velocidade de produção de calor metabólico de $26 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$ para *R. microsporus*. Este valor é bem menor do que o valor de $78 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$ encontrado por Pitol *et al.* (2016) no cultivo com *Aspergillus niger* para produção de pectinases, onde relataram um aumento de 13°C na temperatura do leito em biorreator piloto durante o cultivo com substrato composto de farelo de trigo e bagaço de cana.

No final do cultivo, foram retiradas amostras de diferentes posições e alturas do leito para a determinação da umidade e da atividade de hidrólise e esterificação (Figuras 2D, E e F). O leito apresentou uma boa homogeneidade com relação à umidade do leito. Já com relação à atividade de hidrólise e esterificação, as maiores variações ocorreram no topo do leito, onde a atividade de hidrólise variou de 84 a 125 U g^{-1} e a atividade de esterificação de 7,5 a 10,8 U g^{-1} .

CONCLUSÕES

Não houve problemas de controle da temperatura do leito durante todo o cultivo e não foi observada a compactação do leito. Apesar de a atividade de hidrólise obtida em escala piloto ter sido de apenas 46% da obtida em escala de laboratório, a atividade de esterificação obtida em escala piloto foi 86% da obtida em escala de laboratório. Com relação a homogeneidade do leito, as maiores variações foram observadas no topo do leito, onde a atividade de hidrólise e esterificação variou em torno de 30%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lowry RR, Tinsley JI. 1976. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 53: 470-472.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell DA. 2000. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem* 35: 1153-1169.
- Pitol, LO.; Biz A, Mallmann E, Krieger N, Mitchell DA. 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chem Eng J* 283: 1009-1018.
- Véras IC, Silva FAL, Ferrão-Gonzales AD, Moreau, VH. 2011. One- step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. *Bioresour Technol* 102:9653-9658.