

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ANDRADE

INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL E MODELAGEM DO EFEITO DA
TEMPERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *ASPERGILLUS NIGER* C
EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

SÃO CARLOS – SP

2022

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ANDRADE

INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL E MODELAGEM DO EFEITO DA
TEMPERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *ASPERGILLUS NIGER* C
EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Federal de São Carlos, para obtenção do
título de bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda
Perpétua Casciotori

SÃO CARLOS – SP

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ANDRADE

INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL E MODELAGEM DO EFEITO DA
TEMPERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *ASPERGILLUS NIGER* C
EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do candidato João Victor de Oliveira Andrade, realizada em 13/09/2022:

Orientadora

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciatori
Universidade Federal de São Carlos - DEQ

Examinador

Prof. Dr. Ernesto Antonio Urquieta Gonzalez
Universidade Federal de São Carlos - DEQ

Examinadora

Dra. Clarissa Hamaio Okino Delgado
Universidade Federal de São Carlos - DEQ

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à minha mãe. Sem ela nada seria possível.”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço minha família, pelo apoio constante nas minhas decisões. Principalmente minha mãe, Célia, por todo amor, carinho e por ter me possibilitado educação de qualidade mesmo com todas as dificuldades. Além do meu irmão, Gabriel, pelo incentivo na conclusão dessa importante etapa da minha vida.

A minha namorada, Samantha, pelo amor, companhia e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos amigos de faculdade com quem pude compartilhar inúmeras experiências Antônio, Guilherme, Leonardo, Mariana e tantos outros que auxiliaram no decorrer dessa graduação.

A minha orientadora de Iniciação Científica, orientadora de estágio e orientadora de TG, profa. Fernanda Casciotori, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos que tive ao longo desses anos.

À UFSCar pelas oportunidades que me permitiram crescer profissionalmente.

RESUMO

O desenvolvimento tecnológico de uma matriz energética limpa e renovável se tornou estratégico para o Brasil no qual, o conceito de biorrefinaria tem emergido como de indústria centrada na produção de biocombustíveis, com destaque ao biodiesel. A síntese pela via bioquímica, são necessárias enzimas lipolíticas, que por sua vez podem ser produzidas na própria planta por fermentação em estado sólido (FES), bioprocesso que emprega subprodutos da biorrefinaria como substratos, o que contribui para autossuficiência da unidade. No entanto, dados sobre o metabolismo de fungos produtores de lipases em FES ainda são escassos, dificultando estudos de simulação e de ampliação de escala de biorreatores. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo conduzir tanto investigação experimental quanto de modelagem do efeito da temperatura sobre a produção de enzimas com atividade lipolítica pelo fungo *Aspergillus niger* C cultivado em resíduos agroindustriais. Foram coletados dados da concentração de proteínas e de atividade de lipase obtidos de cultivos em escala de frascos em diferentes temperaturas, assim como foram tomados dados de literatura de atividades enzimáticas de lipase obtidas no cultivo do mesmo fungo, empregando o mesmo substrato. Estes dados foram utilizados para determinação das constantes cinéticas de produção de lipase, com base em modelos de ordem zero, de primeira ordem e logístico, em diferentes temperaturas. De posse das constantes cinéticas, o efeito da temperatura foi modelado pela equação de Arrhenius. Uma modelagem da termoestabilidade das enzimas produzidas também foi realizada, empregando dados da literatura. Com isso, o intuito foi levantar parâmetros cinéticos confiáveis para estudos futuros de simulação da transferência de calor no bioprocesso de produção de lipase para biodiesel em biorreatores de FES.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, Biodiesel, Biocombustíveis.

ABSTRACT

Since the technological development of a clean and renewable energy matrix became strategic for Brazil, the concept of biorefinery has emerged as an industry focused on the production of biofuels, with emphasis on biodiesel. Particularly, for biochemical synthesis of biodiesel, lipolytic enzymes are required, which in turn can be produced in the plant itself by solid state fermentation (FES), a bioprocess that uses biorefinery by-products as substrates, allowing a certain self-sufficiency of the unit. However, data on the metabolism of lipase-producing fungi in FES are still scarce, making simulation and scale-up studies of bioreactors difficult. on the production of enzymes with lipolytic activity by the fungus *Aspergillus niger* C cultivated in agro-industrial residues. Data on protein concentration and lipase activity obtained from flask-scale cultures at different temperatures were collected, as well as data from literature on lipase enzymatic activities obtained from the cultivation of the same fungus, using the same substrate. These data were used to determine the kinetic constants of lipase production, based on zero-order, first-order and logistic models, at different temperatures. With the kinetic constants, the temperature effect was modeled by the Arrhenius equation. A modeling of the thermostability of the enzymes produced was also carried out, using data from the literature. With this, the aim was to raise reliable kinetic parameters for future studies of heat transfer simulation in the bioprocess of production of lipase for biodiesel in FES bioreactors.

Keywords: Solid state fermentation, Biodiesel, Biofuels.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - Fator de frequência

°C - Grau Celsius

Cm - Centímetros

DEQ/UFSCar - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos

E_a - Concentração de enzima ativa

E_{a0} - Concentração de enzima ativa inicial

E_d - Energia de desativação da enzima

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fe - Ferro

F_{Sm} - Fermentação submersa

H - Hidrogênio

H₂O - Fórmula da água

K - Constante de velocidade de reação

k_d - Taxa de desativação da enzima

KOH - Hidróxido de potássio

Mg - Miligrama

Mg - Magnésio

ml - Mililitro

MM - Massa molecular

Mn - Manganês

M/V - Massa de soluto pelo volume da solução

OH - Hidroxila

OR - Radical álcooxila

pH - Potencial hidrogeniônico

p-NPP - Para-nitrofenil-palmitato

PPG-EQ - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

PVC - Policloreto de vinila

R - Constante universal dos gases ideais

RPM - Rotações por minuto

SO₄ - Sulfato

T - Temperatura da reação

t - Tempo de reação (min)

U/gms - Unidades por grama de meio sólido

X - Atividade ou a concentração de proteínas no tempo t

X_m - Valor máximo

X₀ - Valor inicial

Zn - Zinco

μ - Massa específica

μL - Microlitro

μmol - Micromol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Embalagem de polipropileno pronta para incubação	22
Figura 2 – Perfis e parâmetros cinéticos na fermentação em estado de <i>A. Niger</i>	28
Figura 3 – (A) Extratos escuros da linhagem <i>A. niger</i> C; (B) Extratos mais claros da linhagem P50B2	29
Figura 4 – Coloração dos extratos obtidos pela linhagem de <i>A. niger</i> C nos experimentos deste trabalho	30
Figura 5a – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P18E2	31
Figura 5b – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P50B2	31
Figura 5c – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P75P1	32
Figura 5d – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P77C5	32
Figura 5e – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo do fungo <i>T. Harzianum</i>	33
Figura 6 – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo do fungo <i>A. niger</i> C	34
Figura 7 – Gráfico da termoestabilidade de lipase produzida por <i>A. niger</i> C em FES (24 h de exposição a 40, 45, 50 e 65 °C)	35
Figura 8 – Gráfico da regressão linear para obtenção dos parâmetros da equação de Arrhenius para a desativação térmica da lipase produzida por <i>A. niger</i> C	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos cinéticos empregados para ajuste	25
Tabela 2 – Constantes de desativação térmica da lipase e parâmetros de Arrhenius para descrição do efeito da temperatura sobre a taxa de desativação enzimática	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 BIODIESEL E SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO	15
2.2 UTILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	16
2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	17
2.4 FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> E FES	17
2.5 MODELAGEM NA FES	18
3. METODOLOGIA	21
3.1 MICROORGANISMO E SUBSTRATO.....	21
3.2 ENSAIOS FERMENTATIVOS EM ESCALA FRASCOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	21
3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DA ATIVIDADE DE LIPASE DOS EXTRATOS.....	23
3.4 EXTRAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA.....	24
3.5 ANÁLISE CINÉTICA E AJUDA DE MODELOS DE ORDEM ZERO, DE PRIMEIRA ORDEM E LOGÍSTICO	25
3.6 AJUSTE DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS	26
4. DISCUSSÃO E RESULTADOS	27
4.1 PERFIS E PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE <i>A. NIGER</i> C	27
4.2 AJUSTE DE MODELO CINÉTICO A DADOS DA LITERATURA PARA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	29
4.3 MODELAGEM CINÉTICA DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA COM BASE EM DADOS DA LITERATURA PARA TERMOESTABILIDADE DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>A. NIGER</i> C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	34
5. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico de uma matriz energética limpa e renovável se tornou estratégico para o Brasil no qual, o conceito de biorrefinaria tem emergido como de indústria centrada na produção de biocombustíveis, com destaque ao biodiesel. Particularmente, para síntese de biodiesel por via bioquímica, são necessárias enzimas lipolíticas, que por sua vez podem ser produzidas na própria planta por fermentação em estado sólido (FES), processo que emprega subprodutos da biorrefinaria como substratos, permitindo certa autossuficiência da unidade. No entanto, dados sobre o metabolismo de fungos produtores de lipases em FES são escassos, dificultando estudos de simulação e ampliação de escala de biorreatores.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido visando à investigação experimental e à modelagem do efeito da temperatura sobre a produção de enzimas com atividade lipolítica pelo fungo *Aspergillus niger* C cultivado em resíduos agroindustriais. Foram feitos cultivos em escala de frascos em diferentes temperaturas e amostras independentes foram retiradas a cada 24 h até 96 h. Análises de concentração de proteínas e de atividade de lipase foram realizadas para os extratos obtidos ao final dos cultivos, de forma a se determinar constantes cinéticas de produção de lipase a 25 e 30 °C, com base no modelo logístico, que melhor se ajustou a essas temperaturas.

Ademais, também foram feitas análises teóricas e modelagem de dados da literatura. Para tanto, foram utilizados dados de atividades enzimáticas de lipase produzidas pela mesma espécie, com espécie, condições de cultivo e análise similares. Desta forma, foram determinadas constantes cinéticas também para esses dados da literatura, o que não havia sido feito pelo autor tomado como referência.

Além do mais, dada a importância do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, é necessário identificar uma faixa de temperatura na qual as taxas de reação sejam altas, porém não a ponto de desativar a enzima. Dessa forma, torna-se relevante estudar a termoestabilidade das enzimas produzidas, capacidade da enzima de resistir a uma dada mudança em sua conformação tridimensional por conta do aumento da temperatura, podendo haver alterações físicas e químicas na enzima, eventualmente ocasionando perda da atividade enzimática. Posteriormente, foi feita a modelagem cinética da termoestabilidade da lipase produzida, cujos dados experimentais também foram extraídos da literatura. De posse das constantes cinéticas,

o efeito da temperatura foi modelado pela equação de Arrhenius.

Como resultados, têm-se parâmetros cinéticos confiáveis para a produção de lipase fúngica por FES, bem como parâmetros capazes de descrever o efeito da temperatura sobre a termoestabilidade da enzima. Tais parâmetros serão úteis a estudos de simulação do bioprocessamento em biorreatores e da aplicação da lipase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção discorre sobre biodiesel e seus dois processos mais utilizados em sua produção, a transesterificação e esterificação. Neste âmbito, será apresentada a utilização de lipases para a produção de biodiesel por transesterificação. Em seguida, discute-se a FES e a utilização do fungo *Aspergillus niger* na FES. Por fim, discute-se a modelagem da FES, a busca por expressões matemáticas que representem o sistema reacional e que possam ser usados como ferramentas no dimensionamento de biorreatores.

2.1 BIODIESEL E SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO

Diante da perspectiva de esgotamento das jazidas de combustíveis fósseis e da crescente preocupação mundial com o efeito estufa, torna-se estratégico o desenvolvimento de matrizes energéticas renováveis. Atualmente, no Brasil, o conceito de biorrefinaria emerge como o de uma indústria centrada na produção de biocombustíveis líquidos, incluindo biodiesel. Paralelamente, tem-se na biorrefinaria a produção de outras biomoléculas de alto valor agregado, que contribuem de forma importante para a viabilidade econômica do empreendimento, que podem compreender enzimas, pigmentos e outros compostos orgânicos (SANTOS; BORSCHIVER; COUTO, 2010).

Biodiesel é o termo utilizado para se referir ao combustível equivalente ao diesel, porém derivado de fontes biológicas. Quimicamente, o biodiesel é definido como mono-álquil-éster de ácidos graxos de cadeia longa derivada de lipídios de origem renovável (DEMIRBAS, 2002). Assim, o biodiesel é tipicamente produzido através da reação de um óleo vegetal ou de uma gordura animal com metanol ou etanol, na presença ou ausência de um catalisador, para produção de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e de glicerina (DEMIRBAS, 2003).

A transesterificação e a esterificação são os dois processos mais utilizados na produção de biodiesel, apesar de existirem outras opções menos comuns, como micro-emulsões e pirólise. O objetivo desses processos é diminuir a viscosidade do óleo vegetal, assim como melhorar o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel (CAMARGOS DA SILVA, 2005).

A esterificação é o processo de obtenção de ésteres a partir da substituição de

uma hidroxila (-OH) de um ácido graxo por um radical álcooxila (-OR), ou seja, é uma reação de condensação de um ácido carboxílico com um álcool, produzindo éster e água e normalmente sendo catalisada por ácidos (DEMIRBAS, 2003). Reações de esterificação são exemplos de reações reversíveis, sendo a reação inversa conhecida como hidrólise.

Na transesterificação de óleos vegetais, moléculas de triacilglicerol e álcool são transformados em alquil ésteres de ácidos graxos. O processo completo consiste de uma sequência de três reações consecutivas reversíveis, com a formação de mono e diglicerídeos como produtos intermediários (BAJAJ et al., 2010). O processo pode ser acelerado por catalisadores homogêneos (ácido ou base), onde o glicerol produzido contém quantidades significativas de sal como contaminante, ou catalisadores heterogêneos (base, ácido ou enzimas) (MEDINA et al., 2009). Complementarmente, as lipases são enzimas capazes de catalisar o processo de transesterificação, produzindo glicerol livre de contaminantes, não sendo necessária a neutralização dos mesmos, constituindo, assim, uma opção ambientalmente mais atrativa que os processos convencionais (NOGUEIRA et al., 2010).

2.2 UTILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO

As lipases têm sido muito utilizadas no processo de obtenção de biodiesel por transesterificação, pois podem ser tolerantes a solventes orgânicos, além de serem altamente específicas. No entanto, o principal fator que tem restringido a implementação da catálise enzimática na produção de biodiesel em escala industrial são o custo elevado das enzimas (FERRAREZI, 2011). Neste contexto, o uso de resíduos na produção de enzimas pode auxiliar a diminuir os custos de produção, além de aumentar a sustentabilidade devido a diminuição de descartes e possibilidade de obtenção das enzimas na própria planta de produção de biodiesel. Assim, focando-se na síntese de biodiesel pela via bioquímica, a produção de enzimas úteis à obtenção deste biocombustível na própria planta (*in-house*) pode praticamente garantir autossuficiência da biorrefinaria (CASCIATORI; CASCIATORI-FRASSATO, 2018).

Diante do exposto, o uso de produtos pós-consumo na cadeia produtiva e a reinserção dos resíduos nos processos é de grande importância para o

desenvolvimento de um modelo econômico baseado no conceito da economia circular. Este conceito permite a expansão das perspectivas na cadeia de produção do biodiesel, permitindo que o resíduo de um processo se torne matéria-prima de outro, maximizando o aproveitamento de recursos (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2016).

2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Neste contexto, a FES mostra-se como alternativa biotecnológica de obtenção de lipases, além disso, outras moléculas podem ser obtidas no processo, incluindo aplicações clássicas, como antibióticos, e também produtos recentemente desenvolvidos, como compostos bioativos, ácidos orgânicos e biossurfactantes.

A FES pode ser definida como o crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, em situações nas quais o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua e a água está impregnada nas partículas ou forma um fino filme sobre elas. Assim, o teor de umidade da matriz sólida porosa não deve exceder sua capacidade de retenção de água, mas deve ser suficientemente alto para assegurar as condições de crescimento microbiano (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Devido às atividades de água mais baixas nos sistemas de FES em comparação aos de fermentação submersa (FSm), os microrganismos que mais se adaptam a esse cultivo são os fungos filamentosos.

2.4 FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* E FES

O fungo *Aspergillus niger* é considerado um microrganismo promissor para a síntese de lipases por ter a capacidade de produzir mais enzimas do que outros microrganismos estudados em pesquisas relacionadas a altas taxas de sintetização de lipases (UTAMI et al., 2017).

Embora estudos envolvendo otimização da produção de enzimas com diferentes linhagens de *A. niger* mostrem algumas variações em seus resultados, a presença de uma fonte de carbono lipídica mostrou-se essencial para a produção de lipase (MAHADIK et al., 2002). Silveira et al. (2016) demonstrou a potencial utilização dos resíduos do processamento do óleo de dendê para a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus niger* C. Foi conseguida uma atividade de 77 ± 10 U/gms (unidades por grama de meio sólido) para FES utilizando torta de dendê moída como substrato

e borra alcalina como indutor, enquanto que para os cultivos realizados em FSm foi conseguida uma atividade lipolítica máxima de 52 ± 10 U/gms (unidades por grama de meio sólido).

No entanto, apesar de seu excelente potencial de aplicação, a FES ainda não está plenamente estabelecida como alternativa industrial bem-sucedida, sobretudo devido à falta de equipamentos industriais disponíveis e otimizados. A solução desse impasse depende, fundamentalmente, de estudos de engenharia, para o que modelagem e simulação são importantes ferramentas (CASCIATORI et al., 2016).

2.5 MODELAGEM NA FES

A modelagem na FES consiste na busca por expressões matemáticas que representem o sistema reacional, de forma que os modelos, validados com base em dados obtidos em escala laboratorial, possam ser usados como ferramentas no dimensionamento de biorreatores. Por exemplo, um modelo matemático pode prever como a taxa de escoamento do ar, sua umidade relativa e temperatura irão afetar a temperatura e o conteúdo de umidade do substrato; um sub-modelo pode ainda prever como essas variáveis ambientais irão afetar o crescimento microbiano e a formação de produtos (ASHLEY; MITCHELL; HOWES, 1999). Entretanto, existem variáveis complexas como interação entre microrganismo e meio reacional, dessa forma, esses dados precisam ser coletados em estudos empíricos, para que seja obtidas informações sobre as condições ótimas para a metabolização dos produtos de interesse.

Entre os principais problemas na operação desta classe de biorreatores está a remoção deficiente do calor metabólico gerado, em decorrência de fatores associados ao substrato, ao microrganismo e à operação do sistema (CASCIATORI et al., 2013; 2018), diversos modelos matemáticos para transferência de calor na FES em leitos empacotado encontram-se na literatura (SANGSURASAK; MITCHELL, 1995; 1998; VON MEIEN; MITCHELL, 2002; CASCIATORI et al., 2016), apesar de algumas informações básicas requeridas pelos modelos, tais como as características biológicas do microrganismo, serem escassas na literatura e frequentemente adaptadas de um sistema biológico para outro sem uma profunda consideração acerca da validade de tais aproximações.

Como a taxa de geração de calor, um dos termos dos balanços de energia na

FES em leito empacotado, é diretamente associada à cinética do bioprocesso (SANGSURASAK; MITCHELL, 1995; 1998; VON MEIEN; MITCHELL, 2002; CASCIATORI et al., 2016), é importante estabelecer as curvas cinéticas para cada combinação de microrganismo, substrato e produto de interesse, bem como modelar o efeito da temperatura sobre as constantes de taxa determinadas. Considerando que o controle térmico é dificultado em biorreatores em leito empacotado, como já mencionado, o sistema de FES pode experimentar oscilações de temperatura suficientemente grandes para afetar o comportamento cinético do cultivo e, conseqüentemente, a produtividade e o rendimento do bioprocesso.

Assim, é conveniente acoplar, aos modelos de predição de Casciadori et al. (2016), por exemplo, uma equação cinética de produção de enzima, com avaliação do efeito da temperatura sobre o rendimento em atividade de lipase, tendo em vista prever o desempenho do bioprocesso em termos da produtividade e do rendimento do bioproduto de interesse, uma abordagem que é inédita na literatura da área.

Neste contexto, o presente trabalho reuniu investigação experimental e modelagem no intuito de preencher uma lacuna ainda existente para melhor simulação de biorreatores de FES, que é a de obter equações cinéticas e parâmetros confiáveis descrevendo o efeito de variáveis ambientais importantes sobre a taxa de obtenção do bioproduto de interesse. Para desenvolvimento de biorreatores de FES em leito empacotado, por exemplo, que é um dos tipos mais adequados para a produção de enzimas por fungos sensíveis ao cisalhamento (CASCIATORI; THOMÉO, 2015), é necessário um grande conjunto de informações a respeito do microrganismo, do meio e das variáveis operacionais.

Diante do panorama apresentado, o objetivo geral do presente estudo foi estudar a cinética de produção de lipases no cultivo do fungo *Aspergillus niger* C em diferentes condições reacionais, visando a obtenção de parâmetros cinéticos confiáveis para estudos futuros de simulação da transferência de calor no bioprocesso de produção de lipase para biodiesel em biorreatores de FES. Foram objetivos específicos do trabalho: cultivar o fungo a temperaturas variando de 25 a 50 °C e retirar amostras a cada 8, 16 ou 24 h; determinar a concentração de proteínas solúveis no extrato líquido obtido ao final do cultivo; determinar a cinética de produção de lipase com base na atividade lipolítica absoluta e específica do extrato; extrair dados cinéticos da literatura para complementar os testes experimentais; aplicar modelos cinéticos de ordem zero, de primeira ordem e logístico aos dados experimentais e aos

extraídos da literatura; determinar as constantes de taxa de desativação de enzima para dados extraídos da literatura; empregar a equação de Arrhenius para determinar o efeito da temperatura sobre a cinética de produção de enzimas, determinando-se os valores da constante pré-exponencial e da energia de desativação da reação de produção da lipase por FES.

3. METODOLOGIA

3.1 MICROORGANISMO E SUBSTRATO

Foi utilizada a espécie *Aspergillus niger* C (mesofílico), linhagens isoladas originalmente de resíduos de manteiga, cedidas pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ), e que pertencem à coleção de cultura ou micoteca da Embrapa Instrumentação, situada na cidade de São Carlos – SP, uma instituição parceira do DEQ/UFSCar, por meio do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPG-EQ). Para ativação da cepa, o fungo foi repicado em 100 mL de meio nutriente líquido composto por (m/v): extrato de levedura (0,5%), peptona (2%), glicose (3%), MgSO₄.7H₂O (0,05%), ZnSO₄.7H₂O (0,04%), FeSO₄.7H₂O (0,1%) e MnSO₄.7H₂O (0,02 %). Feito isso, o frasco ficou em mesa incubadora rotativa com agitação contínua de 220 rpm, a 30°C por 48 h. Verificou-se a concentração de esporos na suspensão na câmara de Neubauer, sendo ela ajustada para 10⁷ esporos/mL. Com a suspensão, foram preparados tubos criogênicos, os quais foram armazenados a – 80 °C, contendo 0,8 mL de suspensão de esporos e 0,2 mL de glicerol por tubo para posterior inoculação direta no substrato sólido da FES. Como substratos, foram empregados farelo de trigo e farelo de soja (1:1 m/m) adicionados de óleo de oliva (4 %) como indutor. Os farelos foram comprados no comércio local (Agropecuária Claro, São Carlos – SP), e empregados nos cultivos tais como adquiridos.

3.2 ENSAIOS FERMENTATIVOS EM ESCALA DE FRASCOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Segundo Silveira (2018), a temperatura ideal de produção de lipases pelo fungo *A. niger* C é 30 °C, com tempo de cultivo de 72 h. No entanto, para os objetivos do presente trabalho, foram empregadas temperaturas de 25 e 30 °C, com a cinética de cultivo avaliada durante um total de 96 h.

Realizaram-se ensaios fermentativos, em triplicata biológica, em embalagens de polipropileno de 12 cm x 20 cm acoplados com bocal de PVC de 3,6 cm de diâmetro, que foram tampados com algodão envolto por gaze, a fim de garantir a troca

de gases e minimizar contaminações por outros microrganismos. Fixaram-se os tubos de PVC às embalagens com fita adesiva, para garantir que não houvesse troca de gases por outro local que não através dos tampões. Um frasco pronto para a fermentação pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Embalagem de polipropileno pronta para incubação



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para início dos cultivos, pesou-se o substrato (5g por frasco), que foi esterilizado por calor úmido já dentro da embalagem plástica em que posteriormente foi realizada a inoculação da suspensão fúngica (10^7 esporos/frasco). Em seguida, a umidade do meio sólido foi ajustada para 50 % (em base úmida) através da adição de solução de sulfato de amônio 1,2 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0, também previamente esterilizada. Finalmente, homogeneizou-se o material de forma manual, para boa distribuição da solução de umidificação e do inóculo. Realizou-se toda a manipulação em ambiente estéril, proporcionado por câmara de fluxo laminar. Os frascos foram incubados em câmaras de temperatura controlada, na ausência de luz e em condições estáticas, por tempos determinados.

Para as extrações, retiraram-se amostras de todos os cultivos a cada 8, 16 ou 24 h, sendo removido todo o frasco de fermentação (“amostra sacrifício”). Adicionou-se tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 na proporção de 5 mL para cada grama

de substrato e, após maceração manual, os extratos foram filtrados a vácuo em papel filtro, centrifugados a 12000 rpm por 15 min e mantidos sob congelamento a -20°C . O sobrenadante obtido da extração de cada um dos frascos de cultivo foi empregado como extrato bruto para análises de proteínas solúveis e de atividade enzimática de lipase, em triplicata analítica.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DA ATIVIDADE DE LIPASE DOS EXTRATOS

Os extratos foram analisados quanto a concentração de proteínas solúveis em cada um dos tempos dos diferentes cultivos. Para tanto, foi empregado o método de Bradford, no qual 20 μL de amostra e 1 mL do reagente de Bradford foram adicionados em uma cubeta e homogeneizados. As cubetas permaneceram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, e após esse período foi lida a absorbância da mistura em espectrofotômetro a 595 nm. Foi zerado o equipamento com o branco, composto por 20 μL de água e 1 mL do reagente de Bradford, e utilizada uma curva padrão a partir de diluições seriadas de uma solução de soro albumina bovina.

Além disso, determinou-se a atividade hidrolítica das lipases contidas nos extratos enzimáticos brutos obtidos, pelo método de hidrólise do azeite de oliva, de acordo com metodologia descrita por Soares et al. (1999). O método baseia-se na hidrólise de uma emulsão de óleo de oliva e goma arábica (7 % m/v, em água) na razão volumétrica 1:1. Em frasco de Erlenmeyer, foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 e 1 mL do extrato contendo lipases. Feito isso, os extratos foram incubados a 37°C por 10 minutos com agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, paralisou-se a reação pela adição de 10 mL de solução etanol:acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados (produto da reação enzimática) foram titulados com solução de KOH 0,02 M até pH 9,0. Feita a titulação, o cálculo da atividade hidrolítica foi realizado segundo a Equação (1):

$$A_H(U_{\text{azeite}}/\text{mL}) = \frac{(V_a - V_b) 10^3 M}{m t} \quad (1)$$

onde V_a é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b é o volume de KOH gasto na titulação do controle (solução de substrato inicial, sem enzima) (mL); M

é a concentração molar da solução de KOH; m é o volume de enzima utilizado (em mL) e t é o tempo de reação (min).

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, sob as condições de ensaio. Com base no volume de solução utilizado para extração das enzimas, os resultados das atividades enzimáticas foram convertidos para serem expressos em unidades de atividade de lipase por mL do extrato contendo lipases (U/mL).

Ademais, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson em torno da média da concentração de proteínas solúveis e a média da atividade hidrolítica das lipases em cada uma das temperaturas de cultivo, com o objetivo de averiguar se e como as duas variáveis estão associadas entre si. Para tal correlação, se o valor encontrado é menor que zero, tem-se, que as variáveis são inversamente relacionadas. Já para o caso do resultado encontrado da correlação ser igual a +1, tem-se que ela é positiva, isto é, que as variáveis estão diretamente correlacionadas. No entanto, se o resultado ter o valor de zero, não é possível determinar qualquer correlação entre as variáveis analisadas. O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson foi realizado segundo a Equação 2:

$$r_{xy} = \frac{\sum z_x z_y}{N} \quad (2)$$

Onde r_{xy} é o coeficiente de correlação de Pearson; z_x é o desvio padrão da primeira variável; z_y é o desvio padrão da segunda variável e N é número de dados.

3.4 EXTRAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA

Foram utilizados resultados experimentais de estudos com diferentes espécies, porém, com condições reacionais similares para atividade enzimática e cinética enzimática reportados por Silveira (2018) em sua Tese de Doutorado, desenvolvida junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, sob orientação da Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Embrapa Instrumentação) e co-orientação do Prof. Paulo Waldir Tardioli (DEQ/UFSCar) e do Dr. José Manuel Guisán (ICP-CSIC, Madri, Espanha).

No entanto, o autor não havia realizado modelagem cinética, de forma que o

trabalho aqui realizado complementou a análise dos dados. Também foi avaliada a cinética de desativação da lipase produzida, utilizando dados de estabilidade à temperatura, também apresentados no trabalho de Doutorado de Silveira (2018).

3.5 ANÁLISE CINÉTICA E AJUDA DE MODELOS DE ORDEM ZERO, DE PRIMEIRA ORDEM E LOGÍSTICO

Os valores de concentração de proteínas e de atividade enzimática foram tratados e plotados graficamente em função do tempo de cultivo para cada temperatura, resultando na curva experimental de crescimento e produção de enzima em cada condição térmica. A estas curvas, foram ajustados os modelos cinéticos de reação de ordem zero (Equação (3), linear), de primeira ordem (Equação (4), exponencial) e logístico (Equação (5), logística), representados na Tabela 1 e apontados por Viccini et al. (2001) como as equações empíricas mais usadas na descrição de cinéticas em FES. Para facilidade de ajuste, foram utilizadas as formas linearizadas das equações, mostradas na Tabela 1 também nas formas diferencial e integrada.

O melhor ajuste foi adotado para obtenção das constantes cinéticas de produção de enzima em cada temperatura. A qualidade do ajuste, por sua vez, foi avaliada com base no valor do coeficiente de determinação R^2 .

Tabela 1 – Modelos cinéticos empregados para ajuste

Modelo	Forma diferencial	Forma Integrada	Forma linearizada	Eq.
Ordem zero	$\frac{dX}{dt} = k_0$	$X = k_0 \cdot t + X_0$	-	(3)
Primeira Ordem	$\frac{dX}{dt} = k_1 \cdot X$	$X = X_0 e^{k_1 t}$	$\ln(X) = k_1 \cdot t + \ln(X_0)$	(4)
Logístico	$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) e^{-\mu_m t}}$	$\ln\left(\frac{X_m}{X} - 1\right) = \ln\left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) - \mu t$	(5)

Fonte: Elaborado pelo autor

*X representa a atividade ou a concentração de proteínas no tempo t, X_m é o seu valor máximo e X_0 seu valor inicial; k_0 , k_1 e μ são as constantes de taxa dos modelos de ordem zero, de primeira ordem e logístico, respectivamente, ajustados aos dados experimentais de atividade enzimática ou concentração de proteínas.

3.6 AJUSTE DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS

A equação de Arrhenius é a mais conhecida e empregada para relacionar constantes de velocidade de reações à temperatura em que estas ocorrem, podendo incluir reações de produção de enzimas por FES (Saucedo-Castañeda et al., 1990), sendo dada pela Equação (6):

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (6)$$

onde k é a constante de velocidade de reação (que pode ser k_0 , k_1 ou μ), A é o fator de frequência, E_a é a energia de ativação da reação, R é a constante universal dos gases ideais e T é a temperatura da reação, em Kelvin.

Para obtenção dos parâmetros A e E_a para a reação de produção de lipase, foi utilizada a forma linearizada da Equação (6), dada pela Equação (7):

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (7)$$

Os pontos de $k(T)$ (k_0 , k_1 ou μ) obtidos na análise descrita no item 4.4 foram plotados em um gráfico $\ln(k)$ versus $1/T$, e a estes pontos foi feito o ajuste da Equação (7). Assim, os coeficientes linear e angular das retas ajustadas forneceram A e E_a , respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIS E PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE *A. NIGER* C

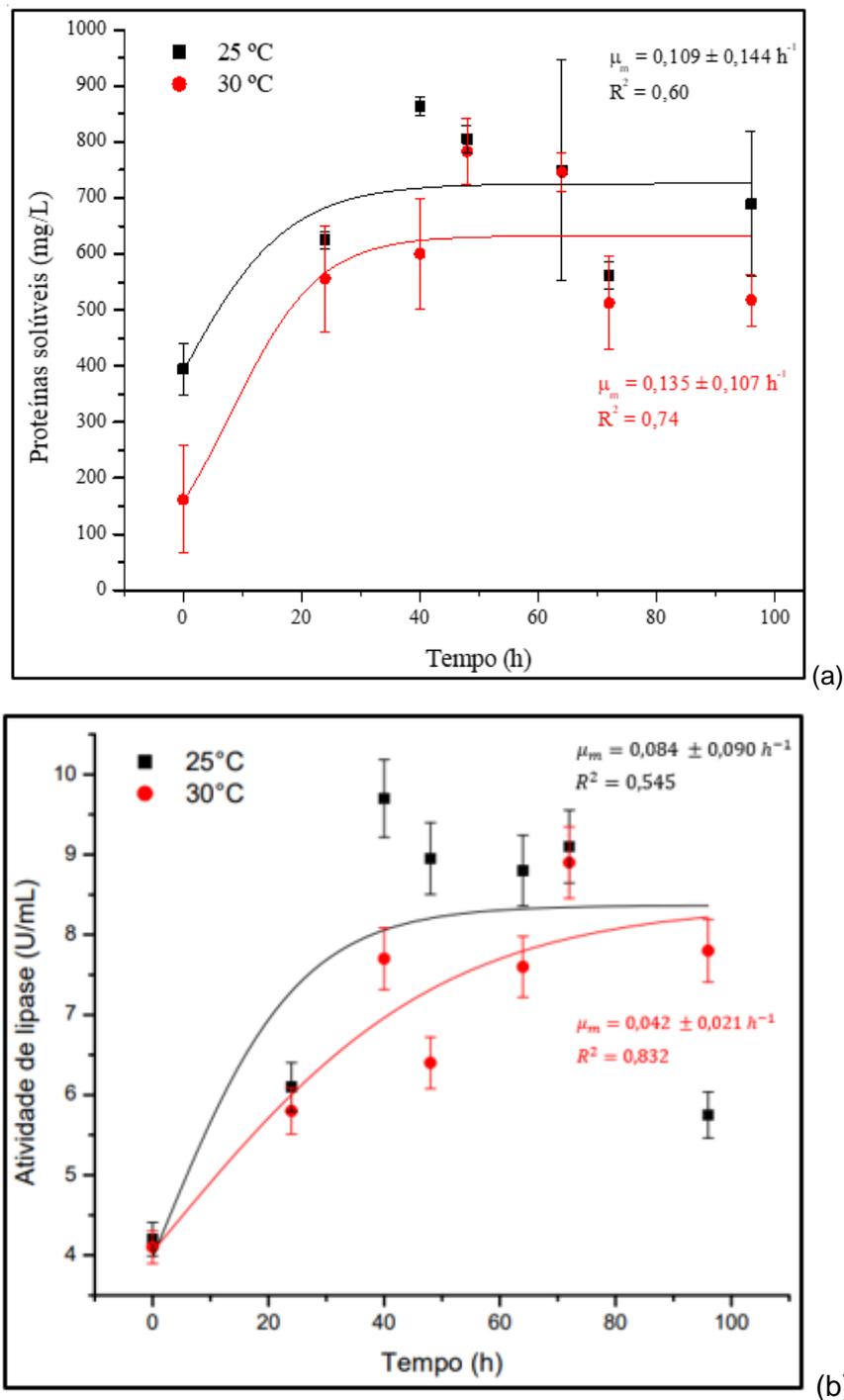
A Figura 2 apresenta os perfis e os parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos sólidos do fungo *A. niger* C às temperaturas de 25 e 30 °C, em substrato composto por farelo de trigo e farelo de soja (1:1 m/m), tendo óleo de soja como indutor. A concentração de proteínas (Fig. 2a) fornece uma indicação indireta do perfil de crescimento do microrganismo, enquanto a atividade de lipase (Fig. 2b), expressa em unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco inicial empregado no cultivo, fornece informação direta sobre a cinética de formação do bioproduto de interesse. Observa-se que ambas as curvas cinéticas apresentam comportamentos crescentes similares, desse modo, realizando a análise de correlação a partir da Equação 2, tendo como parâmetros a média da concentração de proteínas e a média da atividade de lipase, obtivemos o valor de 0,74 para a correlação na temperatura de 25°C, enquanto para a temperatura de 30°C obtivemos o valor de 0,54. Dessa forma, como ambos os valores de correlação encontrados são positivos, é possível afirmar que a produção da enzima está diretamente relacionada ao metabolismo energético, como geralmente é o caso para enzimas hidrolíticas.

Nota-se ainda que as concentrações de proteínas (Fig. 2a) e as atividades de lipase (Fig. 2b) foram crescentes nas primeiras 72 h de cultivo, tendo decrescido posteriormente. Isso pode indicar que proteínas secretadas pelo fungo no início do crescimento foram utilizadas pelo próprio microrganismo como fonte de nitrogênio para manutenção e crescimento nos estágios mais avançados do cultivo. Tal resultado está de acordo com o previsto por Silveira (2018), que havia estabelecido o tempo de 72 h como ótimo para obtenção de lipases a partir da FES deste mesmo microrganismo a 30 °C, empregado o mesmo substrato.

Essas quedas nas curvas, por sua vez, levaram a valores relativamente baixos dos coeficientes de correlação dos ajustes do modelo logístico e a valores altos dos erros dos parâmetros calculados, tanto tendo como resposta a concentração de proteínas quanto a atividade de lipase. Ademais, observa-se ampla variabilidade dos dados referentes aos estágios mais tardios do cultivo, indicando que esse consumo de proteínas nas fases mais avançadas do bioprocessamento é aleatório. Como os erros

dos parâmetros foram maiores do que o próprio valor estimado no caso do cultivo a 25 °C, a análise comparativa com os valores obtidos a 30 °C fica inviabilizada.

Figura 2 – Perfis e parâmetros cinéticos na FES de *A. niger*: (a) para concentração de proteínas solúveis; (b) para atividade hidrolítica de lipase; ajuste logístico, Eq. (5).

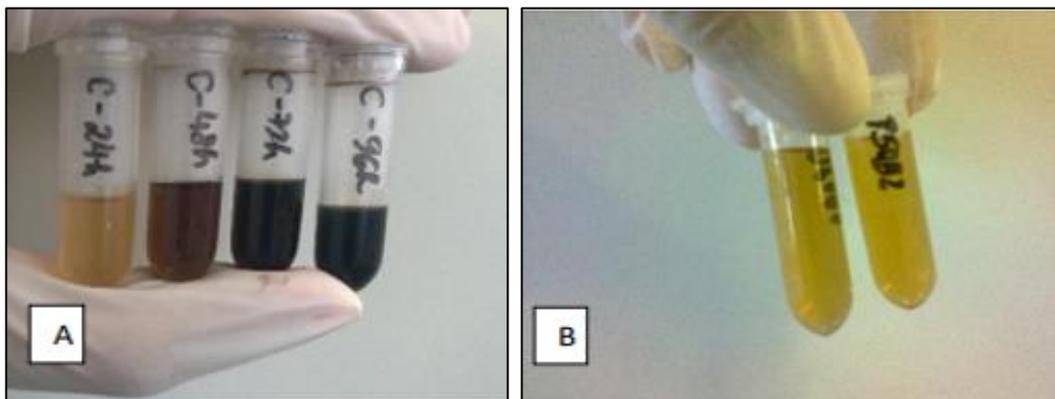


Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 AJUSTE DE MODELO CINÉTICO A DADOS DA LITERATURA PARA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FES

Silveira (2018) utilizou resíduos do processamento do óleo de dendê para a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus niger* C, bem como por outras linhagens e outras espécies de fungos. O autor também testou farelo de trigo como substrato, acrescido de óleo de oliva como indutor. Uma observação feita pelo autor foi com relação à coloração do extrato enzimático, que poderia ser uma medida indireta do crescimento. O extrato oriundo do cultivo de *A. niger* C tornava-se mais escuro com o decorrer do tempo de cultivo, como se observa na Figura 3A. O mesmo não ocorria para cultivo de uma linhagem identificada como P50B2. Nas etapas experimentais do presente trabalho, o mesmo comportamento foi observado com relação à coloração dos extratos produzidos por *A. niger* C (Figura 4). Desta forma, adotar um método espectrofotométrico não é conveniente para análise de atividade dos extratos, razão pela qual adotou-se a titulação potenciométrica para análise de atividade hidrolítica da lipase produzida.

Figura 3 – (A) Extratos escuros da linhagem *A. niger* C; (B) Extratos mais claros da linhagem P50B2.



Fonte: SILVEIRA, 2018, p.57.

Figura 4 – Coloração dos extratos obtidos pela linhagem de *A. niger* C nos experimentos deste trabalho.



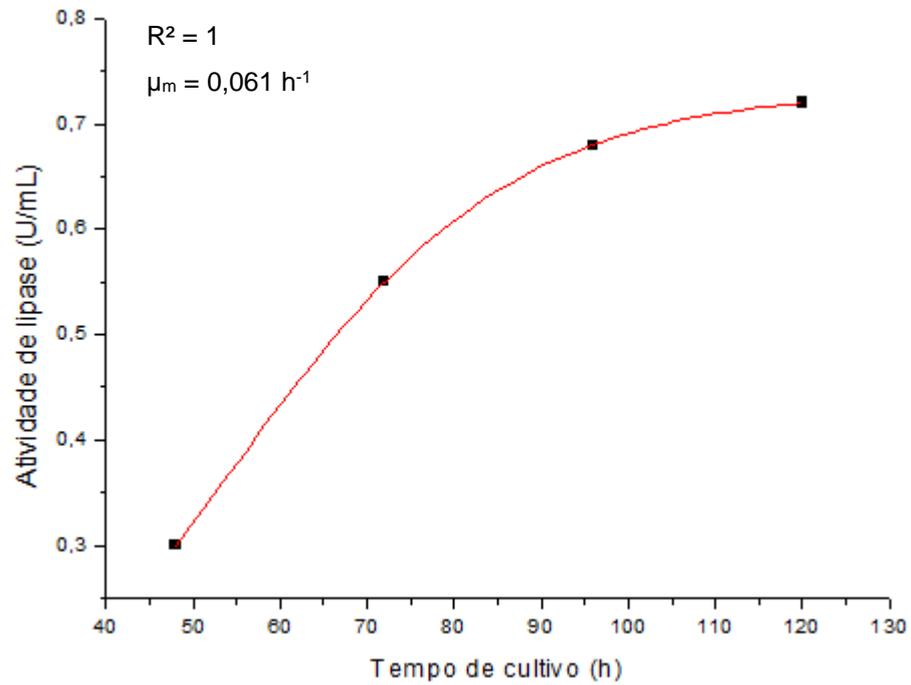
Fonte: Elaborado pelo autor

A sequência de gráficos da Figura 5 (5a até 5e) apresentam pontos experimentais de atividade de lipase obtidos por Silveira (2018) (pontos em preto). O método de quantificação da atividade empregado pelo autor foi o método espectrofotométrico baseado na hidrólise de p-NPP (para-nitrofenil-palmitato), restrito às linhagens fúngicas que forneceram extratos enzimáticos sem coloração escura, o que inviabilizaria o emprego do método espectrofotométrico, como já comentado.

A esses pontos experimentais, foi realizado, no presente trabalho, ajuste do modelo logístico (Equação 5), tendo em vista descrever a cinética de produção de lipases por diversas linhagens fúngicas cultivadas em meio sólido por aquele autor a 30 °C, por até 120 h, tendo farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor. As curvas ajustadas são representadas pelas linhas em vermelho.

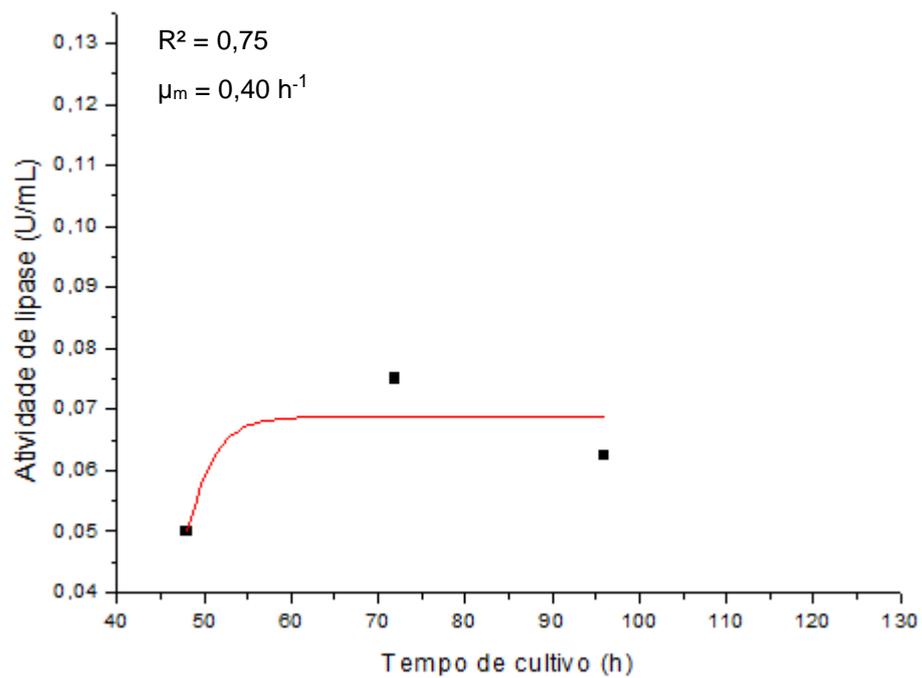
Como se observa, os ajustes foram muito satisfatórios para as linhagens P18E2 e para o fungo *T. harzianum* ($R^2 = 1$), e razoavelmente bons para as demais linhagens fúngicas testadas. As velocidades específicas de produção de atividade lipolítica (μm) são indicadas junto dos respectivos gráficos, assim como o valor do coeficiente de correlação.

Figura 5a – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P18E2



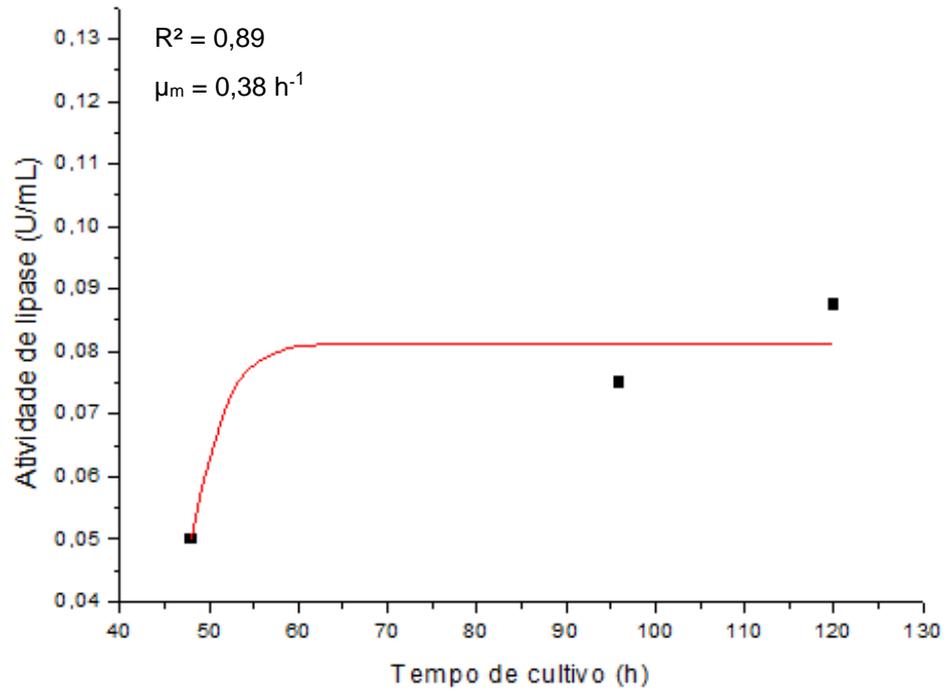
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5b – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P50B2



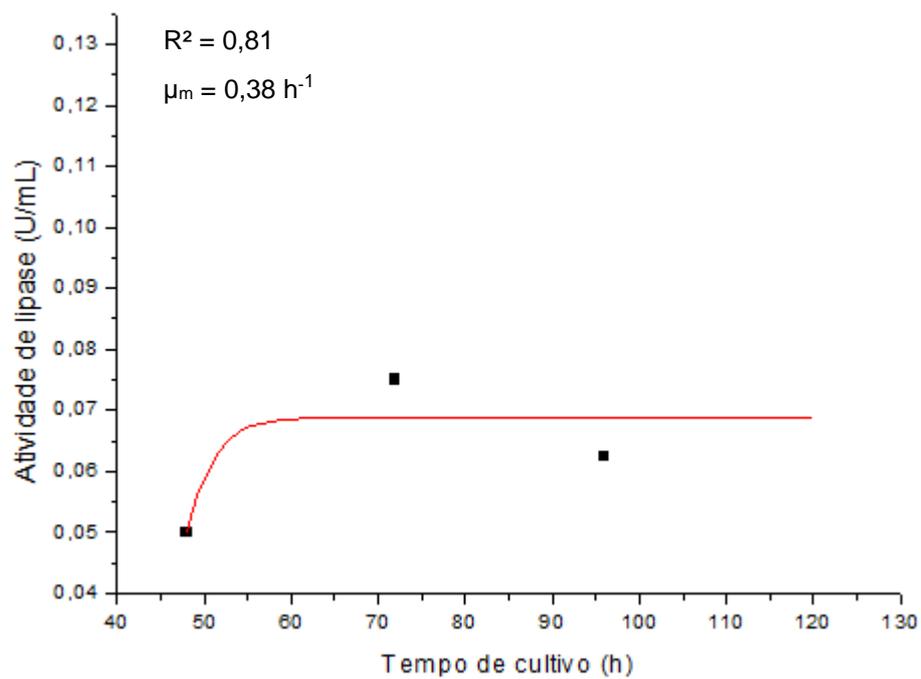
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5c – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P75P1



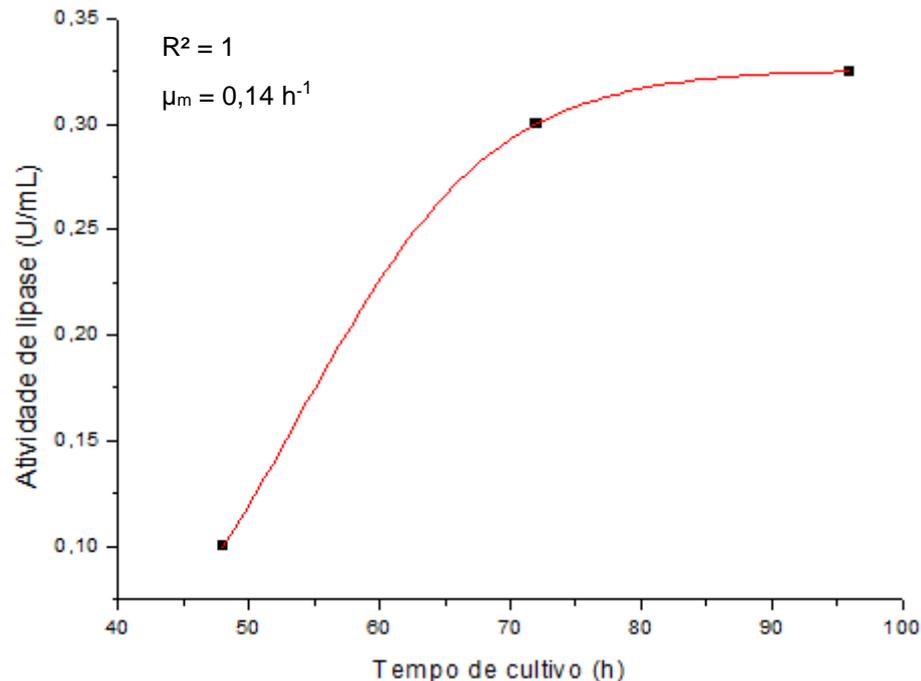
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5d – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo da linhagem fúngica P77C5



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5e – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo do fungo *T. harzianum*.



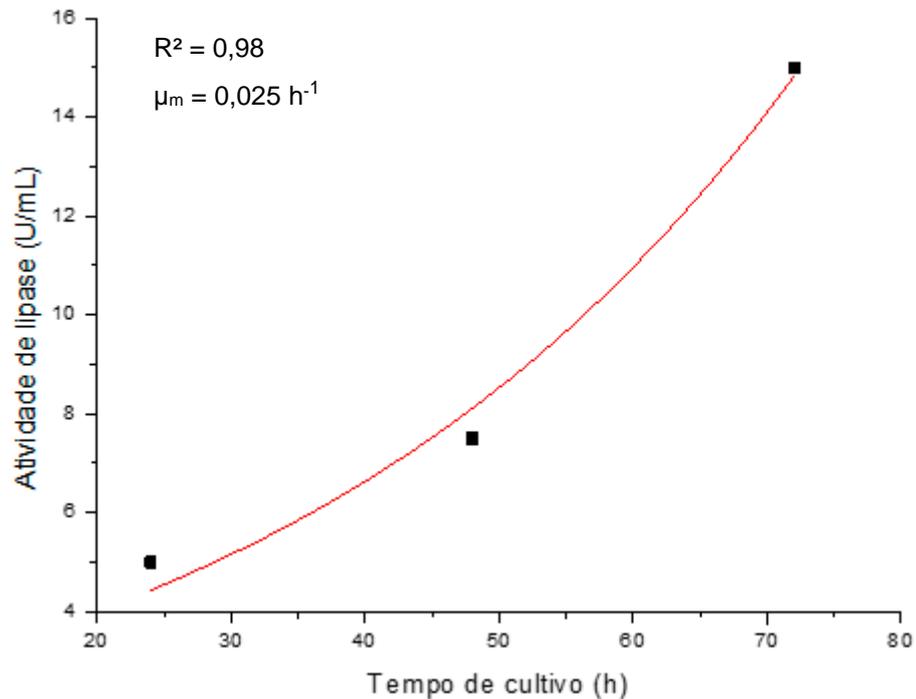
Fonte: Elaborado pelo autor

Para poder comparar a atividade de lipase dos extratos oriundos do cultivo de diferentes linhagens de *A. niger* à atividade dos extratos produzidos pelas linhagens representadas nas Figuras 5a a 5e, Silveira (2018) quantificou também, para todos os extratos com 72 h de cultivo, a atividade de lipase pelo método de titulação dos ácidos graxos liberados da hidrólise de azeite de oliva. Esse foi o mesmo método empregado para obtenção dos dados experimentais reportados na seção 5.1 deste trabalho, conforme descrito na seção 4.3. Com base nos resultados obtidos por este método, o autor selecionou o fungo *A. niger* C para continuidade dos seus experimentos, já que esta linhagem apresentou os maiores níveis de atividade lipolítica dentre as demais linhagens durante o cultivo por FES em farelo de trigo.

Na Figura 6, é apresentada a curva cinética de atividade de lipase de extrato oriundo do cultivo de *A. niger* C em substrato composto por resíduos agroindustriais do processamento do dendê. Os dados experimentais foram extraídos de Silveira (2018) e o ajuste do modelo logístico (Equação 5) foi feito no presente trabalho. O valor de R^2 indica que o ajuste foi bom. Observa-se que a atividade máxima (em torno de 15 U/mL) foi obtida com 72 h de fermentação, após o que os níveis de atividade

decaíram, concordando com resultados experimentais deste trabalho (seção 4.1).

Figura 6 – Gráfico do perfil cinético de atividade lipolítica de extrato em função do tempo de cultivo do fungo *A. niger* C



Fonte: Elaborado pelo autor

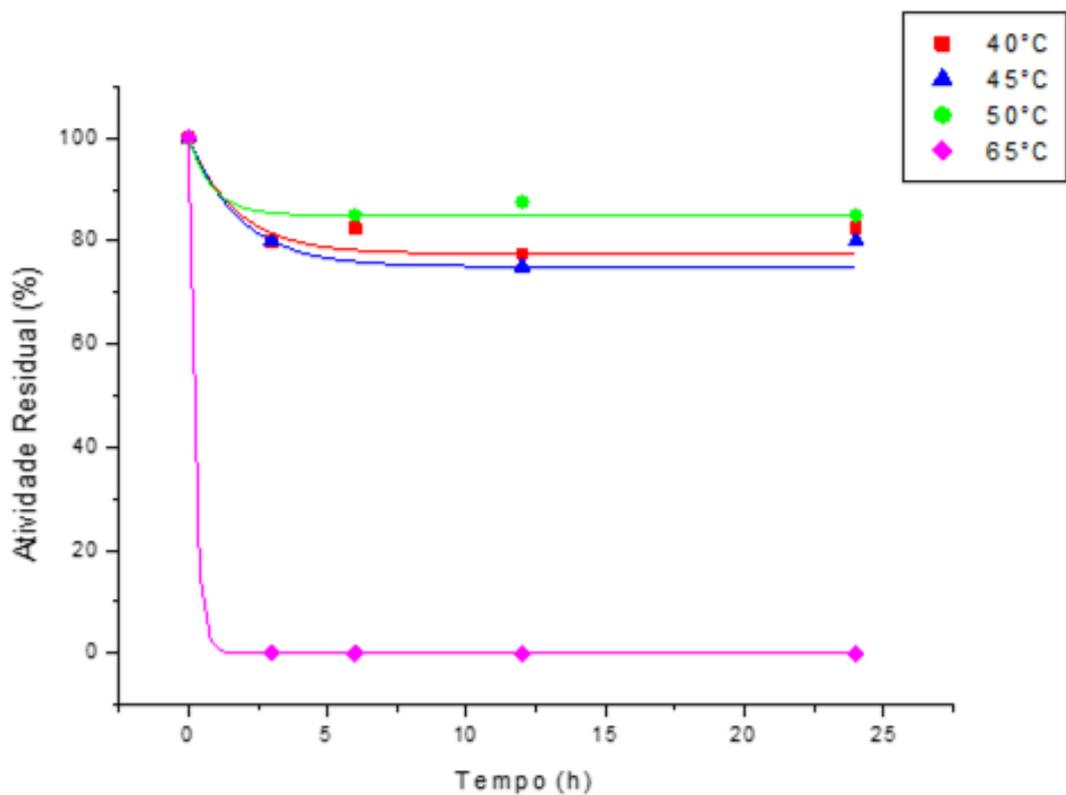
Comparando-se os valores de atividades mostrados nas Figuras 5a a 5e aos da Figura 6, observa-se que o fungo *A. niger* C produziu extratos com atividades de lipase maiores, denotando o excelente potencial deste fungo para a produção de dessa enzima, visando aplicação para biodiesel.

4.3 MODELAGEM CINÉTICA DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA COM BASE EM DADOS DA LITERATURA PARA TERMOESTABILIDADE DA LIPASE PRODUZIDA POR *A. NIGER* C EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Na Figura 7, são apresentados dados da literatura para a estabilidade térmica de lipase produzida pela FES de *A. niger* C em resíduos do processamento do óleo de palma (dados extraídos de Silveira, 2018). Os pontos representam os dados experimentais, enquanto as linhas representam o ajuste do modelo de decaimento exponencial, o que foi feito no presente trabalho. Na análise, o extrato enzimático foi incubado por um período total de 24 h, às temperaturas de 40, 45, 50 e 65 °C. Ao final desse período de incubação, a lipase manteve aproximadamente 80% de sua

atividade original para as temperaturas de 40, 45 e 50 °C. No entanto, após apenas 3 h de exposição a 65 °C, observou-se queda brusca e acentuada da atividade enzimática, havendo perda quase total da atividade. Isso evidencia a desativação da lipase a essa temperatura mais elevada, mesmo após um curto período de exposição (Silveira, 2018).

Figura 7 – Gráfico da termoestabilidade de lipase produzida por *A. niger* C em FES (24 h de exposição a 40, 45, 50 e 65 °C). Os símbolos são os dados experimentais e as linhas são curvas exponenciais de decadência; modelo exponencial: $E_a = E_{a0} e^{-k_d t}$



Fonte: Elaborado pelo autor

Favaro et al. (2020) produziram β -mannanase cultivando o fungo *Aspergillus niger* F12, em uma mistura de resíduos de café e farelo de trigo. Os autores avaliaram a estabilidade da enzima em temperaturas e tempos semelhantes aos de Silveira (2018). O extrato de β -mannanase manteve 90 % de sua atividade inicial após 24 h de incubação à temperatura de 50 °C, valor próximo ao mantido pela lipase a 65 °C, indicando que ambas as enzimas são igualmente termoestáveis a essa temperatura. No entanto, a β -mannanase teve diminuição significativa de sua atividade somente a 70 °C, tendo mantido ainda 50 % de sua atividade inicial após 24 h de exposição. Para

a lipase de *A. niger* C estudada no presente trabalho, observou-se que a enzima foi quase que totalmente desativada a 65 °C, evidenciando que a lipase produzida no estudo é uma enzima menos termoestável que a β -mannanase.

Dado que a equação de Arrhenius é empregada para relacionar constantes de velocidade de reações à temperatura, pode-se incluir reações de produção de enzimas por FES, bem como pode descrever a taxa de desativação da enzima produzida (Saucedo-Castañeda et al., 1990). Ademais, quando enzimas são expostas a altas temperaturas, sua atividade pode diminuir de forma considerável, a energia de desativação da enzima torna-se um parâmetro tão importante quanto a energia de ativação, para diversas aplicações. Um modelo bastante simples de desativação de enzimas pode ser obtido considerando um decaimento exponencial da concentração de enzima ativa em função do tempo de exposição a uma dada temperatura. Tal modelo é representado na Equação 8:

$$E_a = E_{a0} e^{-k_d t} \quad (8)$$

onde E_a é a concentração de enzima ativa (diretamente proporcional à atividade enzimática) no tempo t ; E_{a0} é a concentração de enzima ativa inicial, k_d é a taxa de desativação da enzima e t é o tempo de exposição. Dado em literatura a grande dependência de k_d com a temperatura, normalmente utiliza-se a equação de Arrhenius, adaptada a partir da Equação 6 para descrever a desativação enzimática, conforme Equação 9:

$$k_d = A e^{-\frac{E_d}{RT}} \quad (9)$$

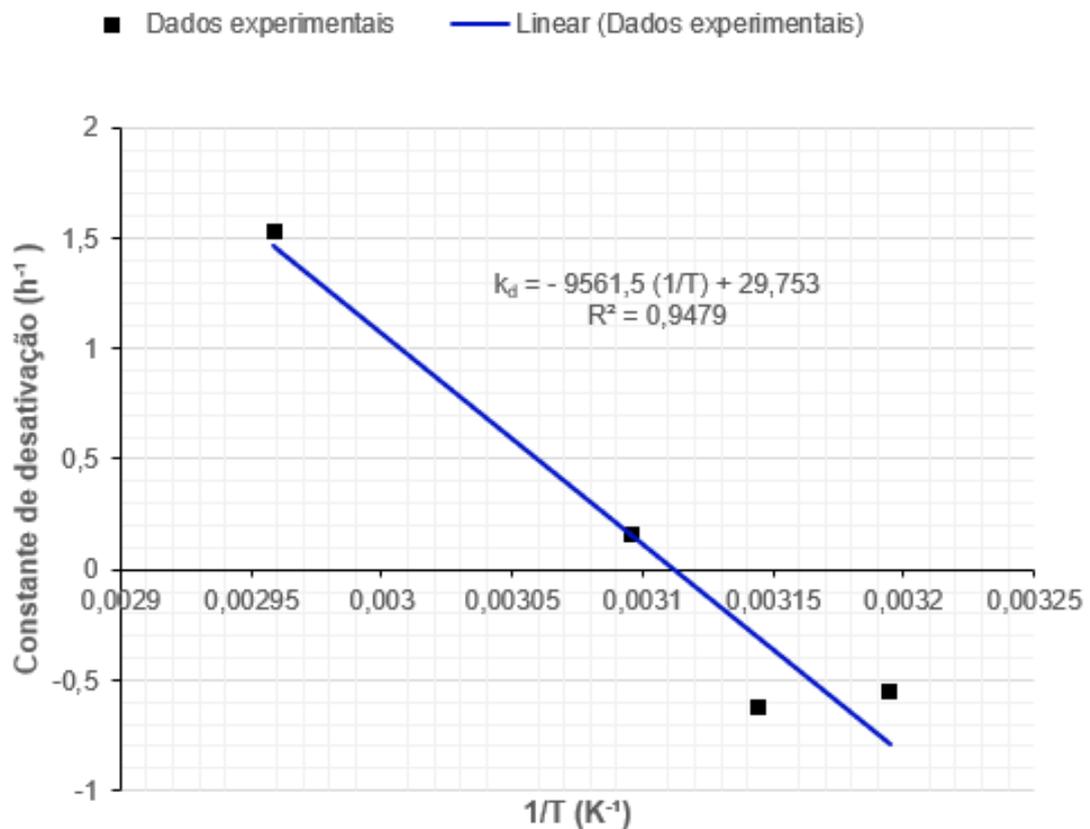
onde k_d é a constante de taxa de desativação da enzima, A é a constante pré-exponencial de Arrhenius (ou fator de frequência), E_d é a energia de desativação da enzima, R é a constante geral dos gases ideais (8,3145 J/mol/K) e T é a temperatura absoluta. Para obtenção dos parâmetros A e k_d para a desativação da lipase, foi utilizada a forma linearizada da Equação 9, dada pela Equação 10:

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (10)$$

A Figura 8 mostra o gráfico de $\ln k_d$ em função de $1/T$, que foi utilizado para

calcular a energia da desativação térmica, obtida a partir do coeficiente angular da reta, bem como a constante de Arrhenius, obtida através do coeficiente linear da reta. Os dados de k_d , bem como os valores de R^2 para os ajustes de atividades enzimáticas residuais em função do tempo às temperaturas de 40, 45, 50, 65 °C, além dos valores de A e E_d , são apresentados na Tabela 2.

Figura 8 – Gráfico da regressão linear para obtenção dos parâmetros da equação de Arrhenius para a desativação térmica da lipase produzida por *A. niger* C.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 - Constantes de desativação térmica da lipase e parâmetros de Arrhenius para descrição do efeito da temperatura sobre a taxa de desativação enzimática

Temperatura (°C)	Constantes de desativação térmica (modelo de decaimento exponencial, Eq. 8)	
	k_d (h ⁻¹)	R ²
40	0,5733	0,8563
45	0,5365	0,9322
50	1,1721	0,9596
65	4,6051	1
Parâmetros de Arrhenius (Eq. 9)		
A (h ⁻¹)	8,34 x 10 ¹²	
E _d (kJ/mol)	79,5	
R ²	0,9479	

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos pela modelagem utilizando a função de decaimento exponencial foram satisfatórios. De acordo com a Tabela 2 e fazendo uma análise em relação ao k_d obtido às diferentes temperaturas, quando houve um aumento na temperatura de 10 °C, passando de 40 para 50 °C, a taxa de desativação da enzima praticamente dobrou. Por outro lado, um aumento de 15 °C, passando de 50 para 65 °C, aumentou cerca de 4 vezes a taxa de desativação enzimática, comprovando o comportamento não linear da desativação da lipase.

Por fim, a energia de desativação térmica encontrada para a lipase foi de 79,5 kJ/mol, valor muito próximo a dados da literatura. Por exemplo, lipase produzida utilizando farelo de soja e casca de arroz como substrato, em sua forma imobilizada (mais termoestável), apresentou constante de desativação térmica de 60,33 kJ/mol (Colla et al., 2015). Em comparação à β -mannanase de Favaro et al. (2020), a lipase foi menos termoestável, uma vez que a energia de desativação térmica para a β -mannanase foi de 147 kJ/mol (Favaro et al., 2020). A faixa usual de muitas enzimas situa-se entre 170 e 400 kJ/mol, conforme Sizer (1943), reforçando que a lipase é uma enzima termossensível.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmaram que a temperatura é variável de supra importância no crescimento microbiano e na cinética enzimática. O cultivo em FES apresentou um nível elevado de crescimento microbiano, e da atividade hidrolítica na faixa de temperatura de 25°C e 30°C. No mais, foi observada alta estabilidade térmica na faixa de 40 a 50°C, durante um período de 24h, no mesmo passo que houve uma queda brusca e acentuada da atividade de lipase, em um curto período de tempo a 65 °C. Desta forma, o conhecimento do efeito desta variável e de parâmetros associados sobre as taxas de crescimento, de formação de bioproduto e de desativação enzimática são extremamente úteis para futuros estudos de produção e aplicações da lipase obtida pela FES de *A. niger* C.

Além disso, a produção de lipase por *A. niger* C foi muito satisfatória utilizando farelos de soja e de trigo (1:1 m/m) e óleo de soja como indutor. Os parâmetros cinéticos encontrados permitem predições de rendimentos do bioproduto de interesse, por meio de estudos de simulação da ampliação de escala do bioprocessamento. Ademais, os estudos de termoestabilidade da enzima forneceram parâmetros importantes para estabelecimento da temperatura de reação enzimática nas etapas da produção de biodiesel, assim como para simulação dessas reações em diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed beds bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 141-150, 1999.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 9–14, 2010.

CAMARGOS DA SILVA, R. R. Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A. Enzymes for the biochemical route of second-generation ethanol: production by solid-state cultivation as a feasible and sustainable alternative. In: BRIENZO, M. (Ed.) *Bioethanol and beyond: advances in production process and future directions*. 1 ed. New York: Nova Science Publishers, 2018. ISBN: 978-1-53613-478-0.

CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, v. 287, p. 103 – 116, 2016.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Utilização de resíduos agro-industriais para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. In: *Tópicos em tratamento de resíduos e meio ambiente*. FREIRE, F. B.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T. (Eds.). Saabrucken: Novas Edições Acadêmicas, 2015. p. 99-128.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant effective thermal conductivity of agro-industrial residues for solid state fermentation. *International Journal of Food Properties*, v. 16, n. 7, p. 1578-

1593, 2013.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, v. 188, p. 97 – 111, 2018.

COLLA, L.M.; FICANHA, A.M.M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T.E.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid state and submerged fermentation. *Biomedical Research International*, p. 1-9, 2015.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Conversion and Management*, v. 43, p. 2349-2356, 2002.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management*, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

FAVARO, C.P.; BARALDI, I.J.; CASCIATORI, F.P.; FARINAS, C.S. β -Mannanase Production Using Coffee Industry Waste for Application in Soluble Coffee Processing. *Biomolecules* 2020, 10, 227

FERRAREZI, A. L. Seleção de fungos termofílicos para a produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry (Oxford)*, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.;

GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MEDINA, A. R.; MORENO, P. A. G.; CERDAN, L. E.; GRIMA, E. M. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 398 – 408, 2009.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONIA, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO, P. A.; FELIX, R. C.; PINTO, J. C.; NELE, M. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 117 – 121, 2010.

OLIVEIRA, M. M.; GONÇALVES, M. F. S. Perspectivas do óleo residual de fritura: uma abordagem econômica, jurídica e socioambiental. *Revista Espacios*, v. 37, n. 52, p. 17, 2016.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. *Chemical Engineering Journal*, v. 60, p. 199-204, 1995.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, p. 739-749, 1998.

SANTOS, M. F. R. F. dos; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. *Revista Economia & Energia*, v. 82, p.14-32, 2012.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; BACQUET, G.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 802-808, 1990.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of Palm Oil Industrial Waste as Feedstock for Lipase Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 179, n. 4, p. 558-571, 2016.

SILVEIRA, E. A. Produção, caracterização e imobilização de lipases e sua aplicação na síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos. 113f. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 2018.

SIZER, I. W. Effects of temperature on enzyme kinetics. In: Nord, F.F.; Werkman, C.H. (Eds.) *Advances in Enzymology – and Related Areas of Molecular Biology*, 1943. <https://doi.org/10.1002/9780470122488.ch2>

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

UTAMI, T. S.; HARIYANI, I.; ALAMSYAH, G.; HERMANSYAH, H. Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. *Energy Procedia*, 136 (2017), pp. 41-46

VICCINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S.; COSTA, R. M.; DALSENER, F. D. H.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technology Biotechnology*, v. 39, 271-294, 2001.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 79, p. 416-428, 2002.