

# OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO ENZIMÁTICO ATRAVÉS DO MONITORAMENTO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

**Fabiana Jung Noel**

Mestre em Engenharia, ULBRA, RS; Pesquisadora do Pólo de Inovação Tecnológica do Paranhana – FACCAT/SCT, RS

**Márcio Ricardo A. Kizner**

Acadêmico Bolsista de Pesquisa do Curso de Engenharia de Produção – FACCAT, RS.

**Michael Cristiano de Souza**

Técnico em Eletrotécnica, CIMOL; Acad. Bolsista de Pesquisa do Curso de Engenharia de Produção – FACCAT, RS

**Waldemir Santiago Júnior**

Pós-Doutor em Engenharia de Alimentos, UFRGS; Pesquisador do Pólo de Inovação Tecnológica do Paranhana – FACCAT, RS

**RESUMO** – A pesquisa “Produção de Enzimas a partir do Soro de Leite”, foi desenvolvida no Laboratório de Química Biotecnológica do Curso de Engenharia de Produção das Faculdades de Taquara – FACCAT, através de convênio com a SCT – Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Neste trabalho, descreve-se um dos objetivos da pesquisa que foi a otimização do processo pela adaptação de *software* de controle do fermentador, acoplado a cromatógrafo a gás para análise de etanol, um subproduto da obtenção da enzima.

Palavras-chave: Otimização, processo biotecnológico, soro de leite, lactase.

**ABSTRACT** - The research "Enzyme Production from the Milk whey", was developed in the Biotechnological Chemistry laboratory of the Course of Engineering of Production of the Faculdades de Taquara - FACCAT, through accord with the SCT - Secretariat of Science and Technology of the State of the Rio Grande do Sul. In this work, describes one of the objectives of the research that was the optimization of the process for the adaptation of software of control of the fermentador, connected to chromatograph the gas for analysis of ethanol, a by-product of the attainment of the enzyme.

Key-words: Optimization, biotechnological process, milk whey, lactase.

**INTRODUÇÃO** – A obtenção de um produto de valor agregado, através da utilização de um resíduo, foi um dos objetivos deste trabalho. Estudou-se um processo viável de utilização do soro de queijo das indústrias de laticínios da região do Vale do Paranhana, a fim de transformá-lo em um produto, evitando que seja descartado no meio ambiente.

A utilização de soro de queijo produzido pela indústria de laticínios representa uma importante fonte de matéria-prima barata para a produção de extratos de leveduras, já que este produto muitas vezes é descartado, gerando um efluente de grande potencial poluente devido sua alta carga de material orgânico[BEN-HASSAN, 1994].

O soro de queijo, obtido em grandes quantidades como resíduo da indústria de laticínios, consiste na parte líquida consequente à precipitação da caseína e é composto basicamente de 5% de lactose, 1 % de proteínas, 0.8 % de sais, 0.5% de ácido láctico, com pH 4.0 [RECK, 1998].

O descarte do soro tem incidência expressiva no custo da indústria de queijos. A pressão ambiental crescente faz com que a projeção deste custo seja ascendente. A demanda biológica de oxigênio (DBO) do soro é de

aproximadamente 40.000 a 60.000 mg/L, fazendo deste um dos mais potentes efluentes orgânicos [DOMINGUES, 2005]. Estima-se que cerca de 100 kg de soro de queijo representa o equivalente ao esgoto produzido por 45 pessoas por dia [MATOS, 2005].

O interesse no estudo da otimização de processos fermentativos resulta da crescente utilização de microorganismos em produção industrial, a minimização do consumo de matérias primas e do tempo de produção, podem ser citados, como estratégias econômicas da otimização de processos biotecnológicos [CARVALHO, 1993].

A determinação de uma estratégia ótima de operação baseada em um modelo matemático do processo que represente o conhecimento obtido acerca do comportamento de um tipo de microorganismo pode aumentar consideravelmente a lucratividade de uma planta industrial. A partir do fornecimento de condições para forçar o microorganismo a apresentar uma maior produtividade e do melhoramento da reprodutibilidade da operação do fermentador, a estratégia de otimizar o processo é alcançada.

As técnicas de otimização e controle podem ser implementadas no processo de produção de pequenas empresas mesmo que estas não disponham de automação industrial. Isto é possível desde que essas empresas utilizem as técnicas desenvolvidas neste projeto através do uso de programa de computador (*software*) que indique qual a melhor forma de operar o processo, sendo a implementação prática executada manualmente na unidade industrial.

As leveduras capazes de produzir a lactase (intracelular) são:

*Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces lactis*

*Cândida pseudotropicalis*

*Brettanomyces anomalus*

*Wingea roberstii*

Entre elas as mais expressivas são as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ou *fragilis*) e *K. lactis*. O mecanismo de absorção e hidrólise da lactose ocorre após seu transporte através da parede celular, mediado pelo sistema lactose permease. Dentro da célula, o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose pela lactase. Estes açúcares são, então, metabolizados através da via glicolítica normal [GEKAS, 1985].

**METODOLOGIA** - O microrganismo utilizado no cultivo, foi o *Kluyveromyces marxianus*, cuja cultura foi obtida por processo de batelada alimentada com alta densidade celular.

O experimento foi realizado em fermentador modelo MA-502/A marca MARCONI (Figura 1). Este fermentador é uma adaptação do modelo disponível, construído em vidro borossilicato, com aberturas na tampa para acoplamento de acessórios tais como: agitação, adição substrato, base, ácido, sondas de medição de temperatura, oxigênio dissolvido e pH, aerador, cuba de vidro borossilicato encamisada sem saída de fundo, chicana de PTFE para eliminar agitação tipo vortex. Foi utilizada uma freqüência de rotação de 300 RPM e o diâmetro do impelidor é de 6,5 cm. O Volume do vaso do fermentador variou de 1 L a 5 L na operação em batelada alimentada. O controle do processo visa obter uma maior produtividade de lactase [JENO, 2001].

O substrato de alimentação foi 1 L de Soro de Leite Elegê 70 g/L (na fase de Batelada) e 4 L à 360g/L (na fase de Batelada Alimentada).

Para controle dos produtos formados e do desaparecimento do substrato oferecido, faz-se necessário à realização de análises químicas off-line; Densidade de células,

Concentração de Lactose (Método Fenol-sulfúrico), Atividade Enzimática (Método ONPG) [AQUARONE, 2001; DUBOIS, 1956; VILLELA, 1972].

Cromatógrafo à Gás modelo 3537R, com dois detetores (FID e TCD), marca CGS, foi utilizado na detecção de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e etanol. O sistema é acoplado ao fermentador, com válvulas automáticas de amostragem, com acionamento por software PeakSimple (Figura 2).

Foi utilizada a lisoenzima (L-6876 – Lysozyme/EC3.2.1.17) para romper a parede celular do microorganismo e possibilitar a análise da lactase. Realizou-se uma ligação em paralelo com colunas do tipo peneira molecular e Porapak de forma a utilizar o detector de condutividade térmica para análise simultânea de O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O etanol foi analisado no detector de ionização de chama.

O software utilizado foi o Visual Designer, (Figura 3) com a função de monitorar as variáveis do processo, estimar os parâmetros cinéticos e controlar a taxa de alimentação do substrato. Este software atua conjuntamente no controle do fermentador e foi modificado para o objetivo do experimento (Figura 4).

Foi adaptado um simulador em EXCEL originalmente utilizado para produção de Penicilina-G-acilase desenvolvido no GBF (Gesellschaft Für Biotechnologische Forschung, Alemanha). Além do simulador em EXCEL, também foi desenvolvido um simulador equivalente no Visual Designer para ser executado com o programa de controle do fermentador.

O modelo utilizado é o seguinte:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$S_f = \frac{dS}{dt} = Y_s \frac{dX}{dt} + mS \cdot X$$

$$\mu_i = \frac{S_f - mS \cdot X}{Y_s X_i}$$

$$X_i = X_{i-1} e^{\mu_{i-1} \Delta t}$$

Onde **X** é o produto (saída) e **S** é a alimentação (entrada).

**RESULTADOS** – O cultivo em batelada alimentada apresenta algumas vantagens como a melhoria da produtividade de proteínas homólogas e heterólogas em cultivos de alta densidade celular e a superação de mecanismos regulatórios celulares: efeito Crabtree, repressão catabólica e inibição por produto.

A alimentação exponencial proposta, baseia-se na alimentação contínua com um perfil exponencial fixo, permitindo, teoricamente o crescimento celular exponencial por alimentação com soro de queijo de acordo com a demanda de crescimento. A alimentação exponencial com controle automático de retroalimentação procura compensar as variações da taxa de crescimento específica ( $\mu$ ) devido a perturbações do processo, por exemplo, mudanças na matéria-prima e produto final obtido, mudanças de temperatura e vazão, restrições operacionais e outras.

*K. marxianus* exibe o efeito Crabtree, causando a fermentação indesejável da lactose para etanol devido à alta concentração de lactose no meio de cultura, mesmo sob condições altamente aeróbicas. A produtividade volumétrica de lactase em culturas de alta densidade celular foi maximizada utilizando a estratégia de controle com otimização online para regular o suprimento de lactose. A taxa de produção enzimática mais alta obtida, foi aquela onde, utilizou-se a estratégia de alimentação batelada exponencial. Esta estratégia de controle otimizante para cultivo aeróbio, maximizou o crescimento da biomassa e a produtividade volumétrica de lactase

(enzima), o controle da produção requer apenas o monitoramento do nível de etanol (subproduto) no gás de saída do fermentador, em culturas com alta densidade celular a estratégia de controle com otimização on-line para regular o suprimento de lactose é a mais indicada.

## REFERÊNCIAS

- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. de A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial v. 2: Engenharia Bioquímica.** 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001
- BEN-HASSAN, R. M.; GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 89-104, 1994.
- CARVALHO, A. P. **Ciência e Tecnologia no Brasil: Uma Nova Política para um Mundo Global.** Rio de Janeiro: UFRJ, 1993.
- DUBOIS,M. et all. Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. **Division of Biochemistry**, Vol. 28, nº3. University of Minnesota: 1956.
- GEKAS,V., LÓPEZ L. M. Hydrolysis of lactase: A literatureReview. In: **Process Biochem**, 20(1), p. 2-3, 1985.
- HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa.** 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro:LTC, 2001. p. 447
- JENO M.; JERVIS, E.J.; MOO-YOUNG, M.; NOR, Z.M.; TAMER, M.I.; Automated Fed-Batch Culture of *Kluyveromyces fragilis* Based on A Novel Method for On-Line Estimation of Cell Specific Growth Rate. **Biochemical Engineering Journal** 9, p. 221-231, 16 de agosto de 2001.
- MATOS, A. T. **Tratamento de resíduos agroindustriais.** Viçosa: AEAGRI, 2005. 128p. (Série. Cadernos Didáticos no. 31)
- RECH, R. **Aproveitamento do Soro de Queijo para a Produção de Lactase por**

***Kluyveromyces marxianus.*** 1998. 74 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

VILLELA, G.G.; BACILA, M. e TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica.** Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1972, 522 p.

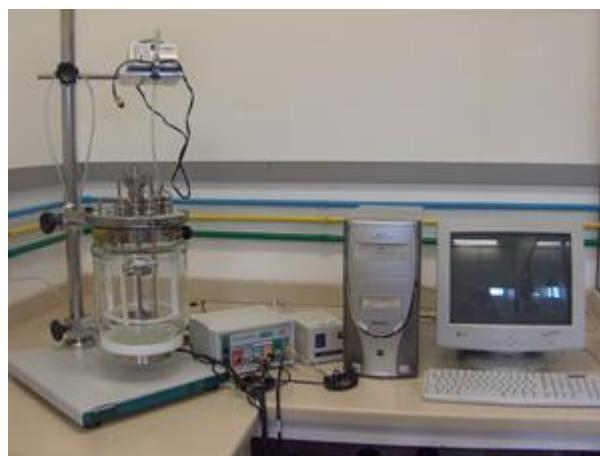


Figura 1 – Fermentador MA-502/A adaptado ao experimento



Figura 2 – Bolsista Pesquisador Michael Cristiano de Souza, operando o Cromatógrafo CG 3537 e software Peaksimple

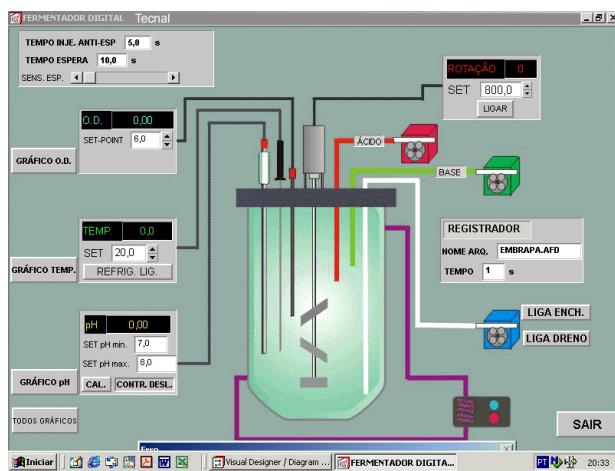


Figura 3 – Software original Visual Designer

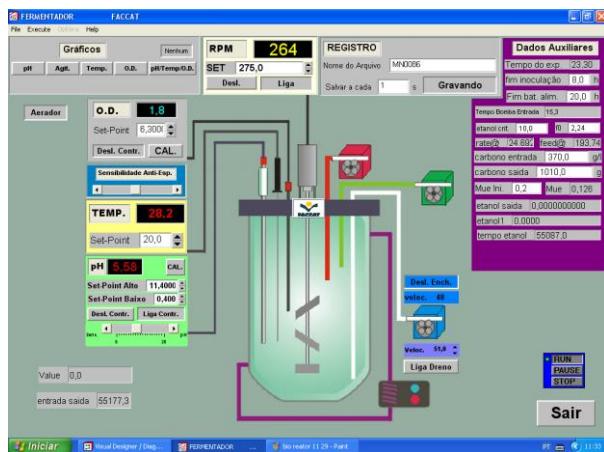


Figura 4 - Software otimizado Visual Designer