

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE ETANOL E BIODIESEL

Mônica Caramez Triches Damaso

Cristiane Sanchez Farinas

Thais Fabiana Chan Salum

INTRODUÇÃO

O uso de enzimas é uma realidade cada vez mais presente nos diferentes setores industriais e consiste em uma alternativa importante aos processos químicos convencionais. As enzimas catalisam as reações de forma específica, minimizando a geração de subprodutos indesejáveis, e atuam em temperaturas amenas, o que reduz o custo energético do processo. Além disso, quando as enzimas estão imobilizadas em suportes sólidos insolúveis, existe a possibilidade de sua reutilização. Estas características distinguem positivamente estas biomoléculas em relação aos catalisadores químicos.

Uma gama de enzimas, dentre elas amilases, lipases, xilanases, celulases, pectinases, peroxidases e queratinases tem sido usada com sucesso nas indústrias de produtos de limpeza, alimentos e bebidas, medicamentos e diagnósticos, cosméticos, síntese orgânica, polpa e papel, fibras têxteis, oleoquímica e tratamento de efluentes (BON *et al.*, 2008a). O setor de biocombustíveis também tem procurado celulases e lipases que consigam atuar de forma técnica e economicamente viável na produção de etanol e de biodiesel, tentando suprir a demanda crescente do setor.

As celulases são usadas para hidrolisar a celulose presente em materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agroindustriais e florestais e gramíneas, em glicose (LYND *et al.*, 2002). A partir desta etapa, a glicose pode ser convertida, via fermentação alcoólica, no chamado etanol celulósico, ou ainda em outros bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinaria. Em se tratando da cana-de-açúcar, principal matéria-prima utilizada para produção de etanol no Brasil, somente um terço da massa da planta, que corresponde ao caldo rico em sacarose, é convertido em etanol (MOLINARI *et al.*, 2011). Porém, utilizando celulases, os outros dois terços (bagaço, palhada e ponteiros), ou uma parte destes, poderiam ser utilizados na produção de etanol celulósico, aumentando a produção do biocombustível sem alterar a área plantada. A produção de etanol celulósico será tratada com detalhes nos capítulos deste livro: “Catálise enzimática para desconstrução de biomassa lignocelulósica”, “Produção de etanol” e “Microrganismos para a produção de etanol: fermentação de pentoses e hexoses”.

A rota enzimática para obtenção de etanol celulósico, em comparação à química, apresenta vantagens como menor demanda de energia, menor geração de efluentes e maior eficiência na ação das leveduras no mosto fermentativo.

O principal obstáculo a ser transposto para aplicação das celulasas na produção industrial de etanol, além da questão econômica já citada, trata-se do fator técnico de obtenção de um coquetel com alta atividade e estabilidade para cada tipo de matéria-prima e de pré-tratamento utilizados.

Com relação à produção de biodiesel por rota enzimática, as enzimas utilizadas são as lipases. Estas enzimas têm a capacidade de atuar tanto na hidrólise de triacilgliceróis como em reações de esterificação e transesterificação, dependendo da quantidade de água contida no meio reacional. No caso da síntese de biodiesel, trata-se de um meio aquo-restrito no qual diversos óleos ou gorduras, sejam de origem vegetal ou animal, virgens ou reciclados, podem ser transformados em biodiesel por reação de transesterificação.

Várias são as vantagens na utilização da catálise enzimática para a produção de biodiesel quando comparada à química, a qual é mundialmente utilizada na indústria. As lipases não levam à formação de sabão, pois podem esterificar os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo e a enzima pode ser reutilizada. A produção de biodiesel por esta rota será tratada com detalhes no capítulo deste livro “Produção de biodiesel por catálise enzimática”.

Apesar de todas as vantagens citadas, ainda existem obstáculos que impedem que o processo enzimático seja utilizado comercialmente na produção do biodiesel. O de ordem econômica consiste no custo de obtenção do biocatalisador. Os de cunho técnico são o longo tempo de reação necessário para a síntese do biocombustível e a inibição e desnaturação das lipases no meio reacional (SALUM *et al.*, 2010).

A fim de vencer os obstáculos técnicos e econômicos para aplicação de enzimas na produção de etanol e biodiesel, várias estratégias têm sido estudadas, como: seleção e engenharia genética para obtenção de novas linhagens hiperprodutoras de enzimas, condições de processos de produção de enzimas e processos de concentração e imobilização de enzimas.

A escolha do microrganismo, meio de cultivo, processo de produção e recuperação dos extratos enzimáticos são fundamentais na busca por aumento de produtividade e de rendimento na produção destas biomoléculas.

Neste capítulo será apresentada uma breve caracterização do mercado de celulasas e lipases e serão abordados, principalmente, dois aspectos técnicos: os processos de produção e de imobilização de lipases e celulasas.

CARACTERIZAÇÃO DO MERCADO DE LIPASES E CELULASES

O mercado global de enzimas industriais atingiu em 2010 a casa dos US\$ 3,6 bilhões. A BBC Research, empresa líder no mercado de inteligência e informação, projeta uma taxa de crescimento neste mercado de 9,1% ao ano, atingindo US\$ 6 bilhões em 2016 (GLOBAL..., 2012).

Segundo Sá-Pereira *et al.* (2008), baseado no estudo *World Enzymes to 2009*, elaborado pela empresa de consultoria Freedonia Group Incorporated, as celulases e lipases estão entre as principais enzimas de aplicação industrial. Estima-se que a demanda mundial por lipases em 2014 será de US\$ 530 milhões, enquanto para celulases de US\$ 430 milhões. Os autores reportam que a aplicação destas enzimas na produção de biocombustíveis é um dos fatores que impulsionarão o crescimento da demanda mundial.

O mercado de enzimas é um oligopólio e conta com a participação de 3 principais fornecedores de enzimas, a Novozymes A/S (sede na Dinamarca), Genencor International Inc. (sede nos EUA) e DSMNV (sede na Holanda), sendo que a maior fornecedora é a Novozymes com uma participação no mercado estimada em 47%, em 2009 (FOCUS..., 2011).

No Brasil existem duas empresas produtoras de enzimas, a Bioenzima Indústria e Comércio Ltda, com capital 100% nacional, localizada em Caruaru (PE) e a Novozymes Latin America Ltda., resultado da fusão da brasileira Novo Industri com a dinamarquesa Nordisk Gentoft, em 1989, e localizada em Araucária (PR).

As empresas produtoras de enzimas fornecem suas formulações para diversos setores, e algumas delas, como a Novozymes, a Genencor e a Transbiodiesel têm investido na elaboração de formulações enzimáticas mais eficientes para produção de biocombustíveis.

PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas podem ser obtidas a partir de fontes animal, vegetal e microbiana. As de origem microbiana são as mais utilizadas atualmente, em virtude do rápido crescimento dos microrganismos, da facilidade de manipulação genética e também por não dependerem de características sazonais, como é o caso das de origem vegetal e nem de processos complexos de separação e purificação, como é o caso das células animais (HASAN *et al.*, 2006).

A produção de enzimas microbianas ocorre por meio de processos fermentativos que diferem entre si por uma série de fatores, tais como o indutor da produção da enzima, o microrganismo utilizado e as condições de processo. Assim, muitas variáveis são possíveis de serem estudadas a fim de se desenvolver processos mais eficientes e de menor custo.

O processo industrial de produção de enzimas por microrganismos, selvagens ou recombinantes, consiste em um conjunto de operações de processo que incluem o tratamento da matéria-prima, o preparo de meios para inóculo e produção, a esterilização e a transformação do substrato em produto por via bioquímica, seguida pela etapa de separação, e normalmente, concentração. Dependendo da finalidade de aplicação da enzima, pode ser necessária também uma etapa de purificação.

A matéria-prima é um dos componentes de maior custo na produção das enzimas, podendo, em alguns casos, corresponder a até 75% do custo final do produto (SCHMIDELL,

2001). A otimização do meio de cultivo para obtenção do máximo de rendimento é uma tarefa árdua, mas pode render muitos frutos, se conseguir reduzir o custo do produto.

A matéria-prima, em alguns casos já contém o indutor da síntese da enzima de interesse, mas caso isto não ocorra, é necessário adicioná-lo, visto que a maioria das enzimas comerciais são obtidas por processos de indução, e não de forma constitutiva. As enzimas constitutivas são aquelas cuja síntese não depende da presença de nenhuma substância específica, enquanto para a produção das enzimas induzidas é necessária a presença de tal substância, chamada indutor. No caso deste capítulo, para produção de celulases é necessário o uso de indutor que contenha celulose na sua composição, já para lipases a presença de compostos lipídicos no meio de cultivo induzirá sua produção.

A produção industrial de enzimas utiliza normalmente culturas puras, portanto todo o processo de produção é conduzido sob condições assépticas, havendo necessidade de algum tipo de esterilização do meio de cultivo. Industrialmente, o mais comum é a esterilização simultânea de meios de cultura e do biorreator, por processo de esterilização descontínuo (ou batelada). Neste processo, ocorre a passagem de vapor saturado sob pressão por serpentinas ou camisas (aquecimento indireto) ou o vapor saturado é introduzido pelo difusor do vaso, sob agitação (aquecimento direto). A temperatura utilizada para a esterilização é 121 °C. Já o ar de processo, normalmente, é esterilizado em sistemas de filtração antes de entrar no sistema.

As duas principais tecnologias para a produção de enzimas são a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES). Os sistemas diferem entre si em relação à quantidade de água disponível no meio de fermentação (MUDGETT, 1986).

Na fermentação submersa o meio é constituído basicamente por água e nutrientes nela dissolvidos (Figura 7A). As técnicas de cultivo submerso têm se beneficiado dos avanços da instrumentação e controle de processos e são bastante utilizados para o cultivo de microrganismos recombinantes, que vem sendo crescentemente empregados para a produção de enzimas. Porém, este tipo de fermentação não é adequado para todo o tipo de matéria-prima/substrato e microrganismo.

A FES é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, no qual o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos. Nestes casos, a matéria-prima funciona como um suporte do microrganismo, dos substratos, do produto e da água adicionada para umedecer o suporte (Figura 7B). Apesar de gotas de água poderem estar presentes entre as partículas, e poder haver finos filmes de água na superfície das partículas, a fase aquosa é descontínua e a maior parte do espaço inter-partículas é preenchida pela fase gasosa, facilitando o processo de transferência de oxigênio (LONSANE *et al.*, 1985). Em virtude da semelhança ao seu habitat natural, fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados para este tipo de fermentação.



Figura 7. A. Fermentação submersa em escala de bancada. **B.** Fermentação no estado sólido em escala de bancada.

O uso da técnica de FES oferece vantagens sobre a FS, dentre as quais, a simplicidade do meio, principalmente para países com abundância de biomassa e de resíduos agroindustriais como o Brasil, e o uso de reatores menores, proporcionando economia de espaço. Destaca-se, ainda, a possibilidade dos rendimentos serem maiores que os obtidos em FS, além da ausência de formação de espuma, menor demanda de energia e, especialmente, a facilidade de controle de contaminação proporcionada pela baixa quantidade de água no sistema (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

A utilização da FES privilegia a sustentabilidade ambiental e o uso racional dos recursos, já que, na maioria dos casos, são empregados resíduos agrícolas e industriais. Porém, existem alguns gargalos que dificultam a implementação desta tecnologia em escala industrial, como: problemas de acessibilidade e disponibilidade do substrato, transferência de oxigênio, e principalmente, as dificuldades em regular os fatores físicos como pH, temperatura e umidade (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

A FES é utilizada em escala industrial somente para a produção de alimentos fermentados tradicionais, como molho de soja, por exemplo. Para a produção de bioprodutos como enzimas, biopesticidas e outros metabólitos, sua aplicação tem sido estudada mais recentemente, e ainda requer um considerável trabalho de pesquisa para ser utilizado em plantas industriais (KHANAHMADI *et al.*, 2006).

Portanto, a tecnologia utilizada industrialmente para produção de enzimas ainda é a FS, que tem como grandes vantagens a homogeneidade dos sistemas fermentativos; a relativa facilidade na transferência de calor e de massa; a facilidade na quantificação celular; e ainda, o melhor controle de condições de cultivo como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, existem muitas informações sobre a cinética e fenômenos de transporte, e desenho de reatores muito bem configurados, além do conhecimento de técnicas de monitoramento e controle já bem estabelecidas se comparado à FES.

A produção industrial de enzimas por FS é conduzida em biorreatores aerados e agitados mecanicamente (Figura 8), em geral com volumes de 20 a 200 m³, chegando até a 1.000 m³, dependendo do tipo de enzima a ser produzida. O microrganismo, agente da fermentação, se desenvolve no seio do meio líquido, sob agitação, e o ar é suprido por borbulhamento no líquido através de um compressor. Tais fermentadores apresentam, basicamente, camisas ou serpentinas internas para as necessidades de aquecimento e refrigeração e sistemas de medidas, como sensores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

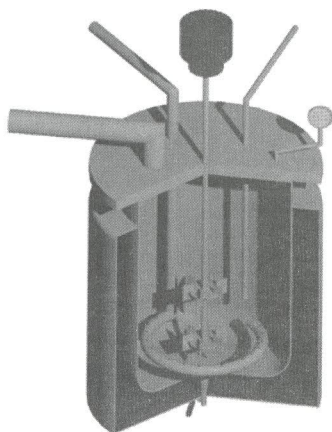


Figura 8. Biorreator aerado e agitado mecanicamente.

A FS pode ser conduzida de diversas formas dependendo do microrganismo, do meio de cultivo e do produto que se pretende obter. Porém, de forma simplificada e generalizada existem três modos de operação para FS: descontínuo ou batelada simples, descontínuo alimentado ou batelada alimentada e contínuo. No sistema de batelada simples, o inóculo é inserido no meio de cultivo contido no biorreator, e aguarda-se o final do processo fermentativo quando então o meio fermentado é retirado e segue para as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto. No sistema de batelada alimentada uma corrente de alimentação que pode conter a fonte de carbono e/ou fonte de nitrogênio, vitaminas, dentre outros componentes, é adicionada ao biorreator ao longo do processo fermentativo, sem que efluente e células sejam removidos do sistema. Já no modo contínuo, ao longo de todo o processo fermentativo, uma corrente de alimentação é adicionada ao sistema, enquanto o meio fermentado é retirado e segue para as etapas de recuperação do produto (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Os dois sistemas em batelada são os mais utilizados para produção industrial de enzimas, embora a batelada alimentada tenha superado o uso da batelada simples. A possibilidade de adição gradual da fonte de carbono como ocorre no processo alimentado, permite contornar os problemas de inibição/repressão causados pelo substrato durante a síntese de várias enzimas, como as celulasas e amilases. Além disso, tem sido a técnica escolhida para a síntese de enzimas heterólogas produzidas por microrganismos geneticamente modificados (BON *et al.*, 2008b).

Após o processo fermentativo, são iniciadas as etapas de *downstream* para obtenção do produto final. Dependendo da finalidade da aplicação da enzima, ela pode ser comercializada

sob a forma de extratos enzimáticos brutos, como é o caso das celulases e lipases para aplicação em biocombustíveis; extratos parcialmente purificados; até enzimas altamente purificadas.

Pelo fato de a maioria das enzimas comerciais serem extracelulares, a primeira etapa do processo de recuperação do produto é separar as células do microrganismo do meio de cultivo, o que pode ser feito por filtração ou centrifugação. No entanto, para as enzimas intracelulares há necessidade de ruptura das células do microrganismo produtor e adição de etapas subsequentes que consigam separar a enzima dos fragmentos celulares.

Como na fermentação submersa a quantidade de líquido é grande, e, portanto, as enzimas ficam diluídas, geralmente há necessidade de concentrá-las, o que pode ser feito por processos de evaporação, precipitação, ultrafiltração ou liofilização, em condições que não causem desnaturação das enzimas. Caso as enzimas tenham uma finalidade na qual as impurezas possam interferir no processo, como o uso medicinal e em química fina, estas devem ser extremamente puras. Para a purificação do produto podem ser utilizadas técnicas como cristalização, cromatografia e extração líquido-líquido (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

A maioria dos extratos enzimáticos comerciais possui além da enzima, compostos que auxiliam na preservação da atividade da enzima ao longo da estocagem, como estabilizantes e conservadores. Este assunto será tratado com detalhes no capítulo “Estabilização de enzimas para o desenvolvimento de formulações líquidas”. A adição de diluentes que padronizem os valores de atividade entre as diferentes bateladas de produção, garantindo a padronização do produto para venda, também é comum (BON *et al.*, 2008b).

O uso de enzimas em escala comercial ainda é proibitivo para alguns processos industriais devido ao seu alto custo. Uma das alternativas para baixar o custo da catálise enzimática é usar enzimas imobilizadas sobre substratos sólidos, aumentando assim sua taxa de utilização.

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é uma técnica que tem como objetivo fixar enzimas a suportes inertes insolúveis. Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou adição de espécies químicas. Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização da preparação enzimática, que tem implicações no custo do processo catalisado enzimaticamente, além de possibilitar a execução de processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos. Um exemplo de indústria que utiliza bastante enzimas imobilizadas é a farmacêutica.

Segundo Forde e Ó'Fágáin (2008), as técnicas de imobilização podem ser classificadas em quatro tipos básicos: ligação ao suporte, confinamento, encapsulamento e ligação inter-cruzada (Figura 9).

- a) Os métodos classificados como “ligação ao suporte” pressupõem a “ligação” da enzima ao suporte por meio de ligações covalentes, ligações iônicas ou adsorção (por interações iônicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou interações hidrofóbicas).
- b) Os métodos baseados em confinamento da enzima envolvem a polimerização de materiais orgânicos ao redor da proteína, resultando no confinamento da enzima

em uma matriz física. Apesar de ser um bom método para manter a conformação das enzimas, tem a desvantagem de dificultar a difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte.

- c) A técnica do encapsulamento consiste na imobilização da enzima no interior de esferas não rígidas, formada por polímero geleiforme e semipermeável ou em membranas fibrosas semipermeáveis, de forma que a enzima fique aprisionada em uma dada região da solução. Este tipo de imobilização também acarreta limitações difusionais.
- d) A ligação intercruzada (*crosslinking*) entre moléculas da enzima é um tipo de imobilização sem suporte. Este procedimento se baseia na produção de agregados tridimensionais de enzimas insolúveis em água por meio de reagentes bi ou multifuncionais, que se ligam covalentemente às moléculas de enzima. O reagente mais comumente utilizado para o *crosslinking* intermolecular é o glutaraldeído. Este método também tem como desvantagem a dificuldade de difusão dos substratos.

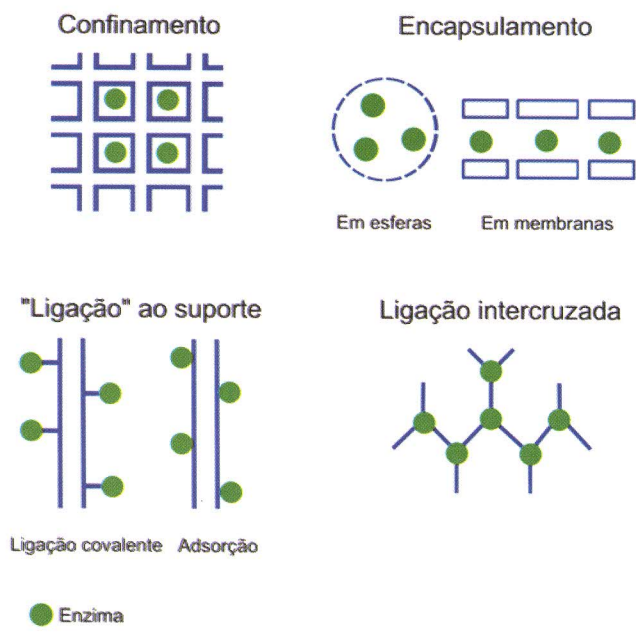


Figura 9. Métodos de imobilização de enzimas.

LIPASES E CELULASES: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA, PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO PARA FINS AGROENERGÉTICOS

Lipases

As lipases constituem um dos grupos de catalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas. Estas enzimas são muito atrativas devido a três principais aspectos: 1) sua alta seletividade (quanto ao grupo funcional e quanto à formação de determinado isômero

