

## Área: Engenharia de Alimentos

# CARACTERIZAÇÃO DOS PROCESSOS SUCESSIVOS DE FILTRAÇÃO TANGENCIAL DE LIPASES DE *Aspergillus niger* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Lais Carteli Cidade, Helen Treichel, Luciane Maria Colla, Marcus Vinicius Tres,  
Vandré Barbosa Brião, Christian Oliveira Reinehr\*

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo  
Fundo, RS*

*Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e  
das Missões, Erechim, RS*

*\*E-mail: reinehr@upf.br*

**RESUMO** – As vantagens da tecnologia de separação com membranas incluem condições de processamento menos severas, baixo consumo de energia e baixo volume de resíduos químicos produzidos. Processos com membranas para os quais a diferença de pressão é a força motriz têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular soluções aquosas. Em função da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, são empregadas membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros. Objetivando caracterizar os parâmetros de processo que influenciam no fluxo permeado de um extrato enzimático contendo lipases e na formação de incrustação na membrana, realizaram-se cinco filtrações tangenciais sequenciais, com membranas de microfiltração e ultrafiltração. Os fluxos permeados obtidos nas microfiltrações com membranas de 20  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  foram de 3224 L/m<sup>2</sup>.h e de 61 L/m<sup>2</sup>.h, respectivamente. Nas ultrafiltrações com membranas de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa os fluxos permeados foram de 74 L/m<sup>2</sup>.h, 80 L/m<sup>2</sup>.h e 20 L/m<sup>2</sup>.h, respectivamente. Apesar do segundo processo de microfiltração e dos três processos subsequentes de ultrafiltração terem apresentado resistências superiores a  $4 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ , observou-se que a incrustação formada nas etapas apresentou uma natureza majoritariamente reversível, podendo ser removida por processos de limpeza.

**Palavras-chave:** Microfiltração, Ultrafiltração, Fluxo permeado, Resistência.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas está em um momento de evolução, em função da melhor compreensão da estrutura de cada enzima, de seu crescente uso e da busca pela otimização dos processos de produção e purificação. O mercado industrial de aplicação de enzimas continua a crescer devido ao desenvolvimento de

novas tecnologias, ao uso da engenharia genética durante a produção e à necessidade de novos campos de aplicação. O mercado global de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010 e espera-se que atinja 4,4 bilhões de dólares em 2015 (BINOD et al., 2013).

As lipases são enzimas muito utilizadas que podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água. Lipases são aplicáveis a diferentes setores industriais (NAGARAJAN, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Após a produção das enzimas torna-se necessário efetuar a separação e purificação das mesmas. A separação e purificação de uma enzima é um dos maiores desafios da área de processos de separação, em virtude das características singulares das partículas que devem ser concentradas (VARDANEGA et al., 2013).

A separação de componentes a partir de uma mistura é uma importante operação unitária. Há diversas tecnologias disponíveis para os processos de separação, com base nas propriedades físicas e químicas da mistura. Um dos processos que está se tornando cada vez mais atrativo é a separação com membranas através da filtração tangencial, em virtude do surgimento de novos tipos de membranas e da modificação de parâmetros de processos, variando a pressão, velocidade tangencial, carga eletrostática e temperatura do sistema (MARELLA; MUTHUKUMARAPPAN; METZGER, 2013).

Apesar dos processos de filtração tangencial com membranas apresentarem diversas vantagens, faz-se necessária uma melhor avaliação dos parâmetros de processo que influenciam na formação de incrustação na membrana, a fim de otimizar o fluxo permeado e, conseqüentemente, a efetiva concentração da enzima. Objetivou-se neste trabalho caracterizar os processos sequenciais de separação por membranas, quando realizada a concentração de lipases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das lipases

Os extratos enzimáticos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de processo de fermentação em estado sólido com o fungo *Aspergillus niger* e subsequente extração das lipases, ambos realizados conforme Colla (2009).

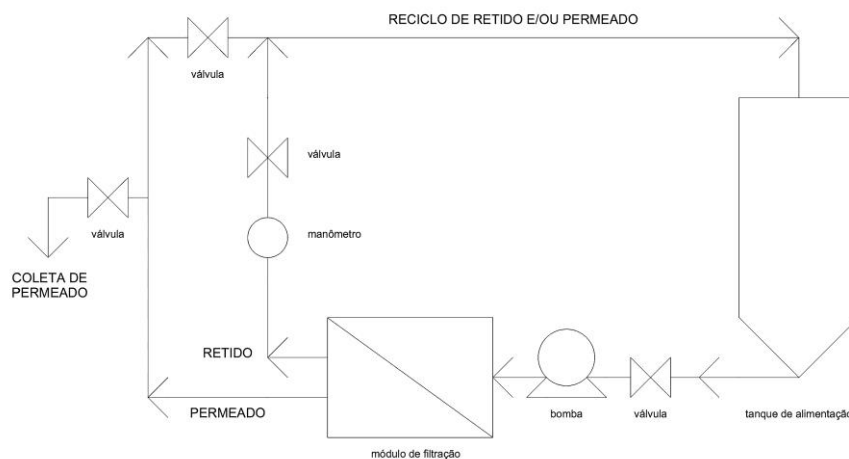
### 2.2 Descrição do equipamento de separação

Os ensaios de concentração das enzimas foram realizados em um módulo de membranas com configuração plana, confeccionado em acrílico. Foram utilizadas cinco membranas planas distintas, sendo duas de microfiltração (de acetato de celulose, com 20  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro) e três de ultrafiltração (de polietersulfona, com massas molares de corte de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa).

Os processos foram realizados sequencialmente, sendo que permeado de cada filtração foi utilizado como alimentação do processo subsequente. A Figura 1 apresenta o diagrama esquemático do aparato

experimental utilizado nos ensaios. O módulo foi projetado para uso com membranas planas de 12,5 cm de comprimento por 6,0 cm de largura, apresentando uma área útil de filtração de 0,006 m<sup>2</sup> (60 cm<sup>2</sup>).

Figura 1 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na concentração de lipases



### 2.3 Avaliação do fluxo permeado

O fluxo permeado ( $J$ ) em cada processo foi determinado pela Equação 1, relacionando o volume de permeado ( $V_p$ ), a área da membrana ( $A_m$ ) e o tempo de filtração ( $t_m$ ).

$$J = \frac{V_p}{A_m \times t_m} \quad (1)$$

### 2.4 Avaliação das resistências

Para a avaliação das resistências de cada etapa do processo de filtração sequencial foi utilizado o modelo de resistências dispostas em série, apresentado na Equação 2, conforme Argüello et al. (2003), sendo a resistência total ( $R_t$ ) calculada de acordo com a Equação 3, relacionando a pressão transmembrana ( $\Delta P$ ), a viscosidade do permeado ( $\mu$ ) e o fluxo permeado ( $J$ ). A resistência da membrana ( $R_m$ ) foi determinada através da filtração com água, enquanto que a resistência da incrustação ( $R_i$ ) foi calculada a partir da filtração e posterior lavagem com água, e a resistência do depósito ( $R_d$ ) foi verificada por diferença das anteriores.

$$R_t = R_m + R_i + R_d \quad (2)$$

$$R_t = \frac{\Delta P}{\mu \times J} \quad (3)$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos de filtração dos extratos enzimáticos foram realizados com pressões que variaram de 20 kPa a 196 kPa, sendo que os resultados médios de fluxo de permeado após os primeiros 5 minutos de filtração são apresentados na Tabela 1, assim como a recuperação de fluxo obtida após a lavagem com água em cada etapa de filtração.

Tabela 1 – Resultados de fluxo permeado dos extratos contendo lipases e posterior recuperação do fluxo

Processo	Fluxo permeado (L/m <sup>2</sup> .h)*	Pressão de trabalho (kPa)	Recuperação do fluxo (%)**
Microfiltração (20 µm)	3223,5 ± 95,5	20	74
Microfiltração (0,45 µm)	60,9 ± 8,0	98	12
Ultrafiltração (100 kDa)	74,4 ± 7,5	98	88
Ultrafiltração (50 kDa)	79,9 ± 9,3	98	59
Ultrafiltração (20 kDa)	20,4 ± 1,9	196	49

\* A partir de 5 min de filtração

\*\* Após lavagem com água

Em todos os processos houve uma queda de fluxo permeado. A queda foi menos acentuada na primeira microfiltração (sob pressão de 20 kPa), mantendo um fluxo superior a 60 % do fluxo de água, em virtude do tamanho do poro ser de aproximadamente 20 µm. A segunda microfiltração demonstrou uma redução de fluxo maior, de cerca de 98 % após 5 minutos de processo, apresentando valores similares aos processos de ultrafiltração posteriores. A primeira e a segunda ultrafiltração mostraram fluxos médios entre 75 L/m<sup>2</sup>.h e 80 L/m<sup>2</sup>.h após os primeiros minutos de filtração, levando a uma redução de fluxo de cerca de 88 % e de 69 %, respectivamente. A terceira ultrafiltração apresentou uma redução de fluxo da ordem de 57 % após os primeiros minutos de processo.

A diminuição do fluxo é atribuída a dois mecanismos principais: bloqueio de poros, responsável pela queda brusca inicial do fluxo, e formação de torta, responsável pela queda gradual de longo prazo. Conforme Song (1998) vários fatores podem afetar esse declínio no fluxo, sendo que o ideal é a busca de uma situação de equilíbrio na pressão de trabalho, de forma a evitar que se forme uma incrustação excessiva na membrana.

A membrana de microfiltração de 20 µm e a membrana de ultrafiltração de 100 kDa apresentaram uma recuperação de fluxo considerável (74 % e 88 %, respectivamente), após o processo de lavagem com água. Deve-se salientar que foi efetuada apenas uma lavagem com água por cerca de 10 minutos a fim de retirar a incrustação do depósito, caracterizada pelos fenômenos de polarização de concentração e formação de torta. Apesar da recuperação de fluxo ter sido menor nas outras membranas deve ser enfatizado que em maior escala

são realizados processos de limpeza nas membranas utilizando agentes químicos detergentes, oxidantes e até enzimas, a fim de retirar as partículas mais fortemente aderidas à membrana.

A Tabela 2 apresenta as resistências total, da membrana, da incrustação (deposição irreversível na membrana, por adsorção ou bloqueio interno de poros) e do depósito (deposição reversível e/ou polarização por concentração) ao fluxo de permeado. A avaliação das resistências em série foi utilizada para determinar a proporção de contribuição de cada parcela para a redução do fluxo de permeado.

À medida que o tamanho do poro (ou massa molecular de corte) das membranas diminuiu houve um aumento na resistência da membrana. A membrana de microfiltração de 0,45  $\mu\text{m}$  apresentou uma resistência 4,6 vezes menor que a membrana de ultrafiltração de 100 kDa, enquanto que esta membrana apresentou uma resistência 27,2 vezes superior que a membrana de ultrafiltração de 20 kDa.

Tabela 2 – Resistências calculadas para os processos de microfiltração e ultrafiltração das lipases fúngicas

Processo	$R_t$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_m$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_i$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_d$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )
Microfiltração (20 $\mu\text{m}$ )	0,022	0,014	0,005	0,003
Microfiltração (0,45 $\mu\text{m}$ )	5,797	0,120	0,878	4,800
Ultrafiltração (100 kDa)	4,745	0,552	0,075	4,118
Ultrafiltração (50 kDa)	4,418	1,390	0,966	2,063
Ultrafiltração (20 kDa)	34,612	15,023	15,636	3,953

$R_t$ : resistência total,  $R_m$ : resistência da membrana,  $R_i$ : resistência da incrustação,  $R_d$ : resistência do depósito.

Com exceção da primeira microfiltração do extrato enzimático, que apresentou um valor de resistência total mais de 100 vezes inferior, os demais processos de filtração tiveram resistência superior a  $4 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ . As resistências do primeiro e do segundo processo de ultrafiltração foram inferiores à da segunda microfiltração porque neste processo houve a retenção de partículas que provocariam uma resistência elevada nos processos subsequentes a partir do bloqueio completo de poros e conseqüente formação de torta. Estes resultados mostram a vantagem de serem efetuadas filtrações sequenciais com a diminuição gradual do poro da membrana para evitar um aumento excessivo na resistência do processo quando utilizada diretamente uma membrana de ultrafiltração, levando também à diminuição de sua vida útil.

A resistência da incrustação, caracterizada pelo bloqueio interno dos poros ou pela adsorção irreversível na membrana, foi maior na segunda microfiltração e na terceira ultrafiltração. O bloqueio interno dos poros na membrana de 20 kDa pode ser explicado pela presença de peptídios pequenos nessa etapa, ficando adsorvidos na estrutura interna da membrana.

A resistência do depósito, caracterizada pela camada responsável pela polarização por concentração e pela torta posterior formada, foi cerca de mil vezes menor na primeira microfiltração. Os quatro processos sequenciais de filtração apresentaram resistência do depósito entre  $2,1 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$  e  $4,8 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ , indicando que boa parte da incrustação pode ser removida das membranas a partir de processos simples de limpeza.

## 4 CONCLUSÃO

A utilização de processos sequenciais de separação por membranas tornou possível a manutenção de fluxos de permeado superiores a 60 L/m<sup>2</sup>.h na microfiltração com membrana de 0,45 µm, de 74 L/m<sup>2</sup>.h, 80 L/m<sup>2</sup>.h e 20 L/m<sup>2</sup>.h nos processos de ultrafiltração com membranas de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa, respectivamente. A incrustação formada nos processos de filtração apresentou-se majoritariamente de natureza reversível, podendo ser removida por processos de limpeza para reutilização posterior das membranas.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UPF pela bolsa de iniciação científica disponibilizada (PIBIC/UPF).

## 6 REFERÊNCIAS

- ARGÜELLO, M. A.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F. A.; ÁLVAREZ, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation. **Journal of Membrane Science**, v. 216, p. 121-134, 2003.
- BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes – Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.
- COLLA, L. M. **Otimização da produção biotecnológica de lipases e correlação com a produção de biossurfactantes**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, 2009.
- MARELLA, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; METZGER, L. E. Application of membrane separation technology for developing novel dairy food ingredients. **Food Processing & Technology**, v. 4, p. 1-5, 2013.
- NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends – microbial lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486–520, 2012.
- SONG, L. Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 139, p. 183-200, 1998.
- VARDANEGA, R.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1087-1093, 2013.