UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA DE FÁTIMA DOMINGUES

Avaliação do potencial metanogênico de gorduras do leite hidrolisadas

Pirassununga

2014

RENATA DE FÁTIMA DOMINGUES

Avaliação do potencial metanogênico de gorduras do leite hidrolisadas

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Giovana Tommaso

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

D671a Domingues, Renata de Fátima
Avaliação do potencial metanogênico de gorduras do
leite hidrolisadas / Renata de Fátima Domingues. --
Pirassununga, 2014.
58 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tommaso.

1. Digestão anaeróbia 2. Metano 3. Metanogênese
4. Gorduras 5. Pré-tratamento enzimático. I. Título.

*Dedico a Deus,
ao meu amado filho Álvaro Domingues Garcia,
a Lucas Felipe Rodrigues dos Santos Garcia,
aos meus pais e irmã.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pai celestial, que me ama incondicionalmente e que me manteve firme em meus propósitos mesmo quando tudo parecia impossível.

Ao meu filho amado Álvaro Domingues Garcia, por fazer parte desse trabalho de modo tão profundo, ainda em meu ventre e após nascimento, dando-me alegrias e me fazendo sentir amada e necessária de modo tão único.

A Lucas Felipe Rodrigues dos Santos Garcia, por acreditar que seria possível, bem como minha família e amigos pelo apoio e confiança.

À Prof. Dra. Giovana Tommaso, que durante esses anos, muito me ensinou, ajudou e confiou, contribuindo para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Ao Prof. Dr. Raul Franzolin Neto, pela oportunidade e ajuda.

A Guilherme de Sousa Silva, Tatiana C. Sanches e Pedro Augusto Soares e Silva pela contribuição substancial.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro neste trabalho.

RESUMO

DOMINGUES, R.F. **Avaliação do potencial metanogênico de gorduras do leite hidrolisadas**. 2014. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Lipídeos contidos em resíduos de laticínios além de representarem uma perda industrial importante, interferem negativamente nos sistemas de tratamento de efluentes inibindo a atividade microbiana do consórcio (Mendes, 2005). O objetivo do presente trabalho foi estudar a degradação anaeróbia de gorduras do leite hidrolisadas com duas enzimas: lipase comercial de *Candida rugosa* (éster-inespecífica), e preparado enzimático de *Geotrichum candidum* (lipase éster-específica). Determinaram-se condições ótimas de hidrólise de gorduras do leite no tocante a tempo e temperatura de processo. Após esta etapa, determinou-se a produção metanogênica advinda da estabilização de esterco bovino combinado com gorduras de laticínios hidrolisadas e *in natura*. As condições ótimas de ação de lipase comercial de *C. rugosa* em gorduras do leite foram obtidas com temperatura de 40°C e pH de 6,5. As condições ótimas de ação de preparado enzimático de *G. candidum* foram obtidas com temperatura de 40°C e pH de 7,5. Os tempos de processo hidrolítico para a produção máxima de ácidos graxos foram de 8 horas e 16 horas quando se utilizaram preparado enzimático de *G. candidum* e solução de lipase comercial de *C. rugosa* respectivamente. As velocidades de processo, bem como os valores de biodegradabilidade anaeróbia, produção metanogênica específica e coeficiente de conversão (Yp/s) indicaram ser muito mais eficiente a utilização lipase de *C. rugosa* na hidrólise das gorduras do leite, quando o objetivo do processo é a produção de biogás. Além disso, o preparado enzimático de *G. candidum* ocasionou inibição da atividade metanogênica acetoclástica. Quando se realizou um estudo variando-se a concentração de gordura no tratamento enzimático, obteve-se a maior produção de ácido oléico quando se utilizaram 42 gramas de gordura por grama de enzima. Por outro lado, o melhor fator de conversão entre produto e substrato foi verificado quando a relação entre a massa de gordura e a massa de enzima foi igual a 6g/g.

Palavras chave: digestão anaeróbia, metano, metanogênese, gorduras, pré-tratamento enzimático.

ABSTRACT

Domingues, RF Evaluation of methanogenic potential of hydrolysed milk fat. 2014. F 49. Thesis (Master) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2014.

Lipids in dairy waste as well as representing an important industrial loss, interfere negatively in wastewater treatment systems by inhibiting microbial activity of the consortium. The aim of this work was to study the anaerobic degradation of hydrolyzed milk fats using two enzymes: lipase from *Candida rugosa*, which is an ester unspecific enzyme; and other specific lipase obtained from *Geotrichum candidum*. Optimal conditions for hydrolysis of milk fat regarding pH, time and temperature were determined. After that, the methanogenic production from the stabilization of cattle manure combined with fats (hydrolyzed and *in nature*) was evaluated. The optimum conditions for the action of commercial *C. rugosa* lipase were obtained at 40°C and pH 6.5. The optimum conditions for the action of *G. candidum* preparation were obtained at 40°C and pH 7.5. Maximum product concentrations were obtained within 8 hours and 16 hours when preparation of *G. candidum* and *C. rugosa* lipase were used, respectively. The initial methanogenic production rate, the values of anaerobic biodegradation, the specific methanogenic production and the methane yield as well, showed that the use of *C. rugosa* lipase in the hydrolysis of fats is more efficient when the goal of the process is the production of biogas. The use of the enzymatic preparation of *G. candidum* did not cause any benefits, and in addition, caused bigger inhibition of acetoclastic methanogenic activity. When the initial concentration of substrate was varied for the enzymatic treatment, it was possible to verify higher oleic acid accumulated production when 42 grams of fat were used per gram of enzyme. On the other hand, the higher conversion factor between product and substrate was obtained when the relation between the mass of fat and the mass of enzyme was 6g/g.

Keywords: anaerobic digestion, methane, methanogenesis, fats, enzymatic pretreatment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Biodigestão Anaeróbia	17
3.2. Lipídeos como inibidores do tratamento anaeróbio	18
3.3. Aplicação de lipases como auxiliares na degradação de lipídeos	19
3.4. Considerações finais	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Desenho experimental	24
4.2. Caracterização do lodo anaeróbio	24
4.2.1. Inóculo	24
4.2.2. Caracterização microbiana	25
4.2.2.1. Microscopia	25
4.2.2.2. Atividade metanogênica específica	25
4.3. Determinação das condições ótimas de hidrólise	25
4.3.1. Determinação de atividade enzimática	26
4.3.1.1. Preparo e padronização da solução de KOH alcoólica a 0,05N	26
4.3.1.2. Construção da curva-padrão de ácido oleico	26
4.3.2. Medida de atividade enzimática	28
4.3.3. Determinação do pH ótimo	29
4.3.4. Determinação da Temperatura Ótima	29
4.3.5. Determinação do tempo de processo de hidrólise de manteiga com lipase comercial de <i>C. rugosa</i>	28
4.3.6. Determinação do tempo de processo de hidrólise de manteiga com lipase comercial de <i>G. candidum</i>	30
4.3.7. Otimização da hidrólise de gorduras utilizando lipase de <i>C. rugosa</i>	30
4.4. Análise de biodegradabilidade anaeróbia (BA)	30
4.5. Determinação da toxicidade	32
4.6. Otimização da hidrólise de gorduras utilizando lipase de <i>C. rugosa</i>	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Caracterização dos resíduos e substratos	35

5.2. Caracterização enzimática	36
5.2.1. Enzima de <i>Geotricum candidum</i>	36
5.2.2. Enzima de <i>Candida rugosa</i>	38
5.4. Ensaio comparativo de biodegradabilidade anaeróbia de gorduras do leite in natura e hidrolisadas por enzima de <i>G. candidum</i> de <i>C. rugosa</i>	41
5.4.1. Caracterização da biomassa	41
5.4.2. Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia	42
5.5. Ensaio de verificação de toxicidade	47
5.6. Variação da concentração de substrato na formação de produtos de hidrólise da manteiga	48
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 3.1 – Condições de processo de hidrólise de lipídeos em resíduos gordurosos agroindustriais	22
Figura 4.1 – Desenho esquemático do experimento realizado	24
Figura 4.2 – Curva-padrão de ácido oleico com meio de reação formado por óleo de oliva e goma arábica.....	28
Figura 4.3 – Curva padrão do transdutor de pressão utilizado no primeiro ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia.....	33
Figura 5.1 – Valores de atividade enzimática do preparado enzimático líquido de <i>G. candidum</i> atuando sobre manteiga na faixa de temperatura estudada	37
Figura 5.2 – Valores de atividade enzimática do preparado enzimático líquido de <i>G. candidum</i> atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada	37
Figura 5.3 – Concentrações de ácidos ao longo do tempo de hidrólise da manteiga utilizando-se preparado enzimático de <i>G. candidum</i>	38
Figura 5.4 – Valores de atividade enzimática de solução de lipase comercial de <i>C. rugosa</i> com atuando sobre manteiga na faixa de temperatura estudada	39
Figura 5.5 – Valores de atividade enzimática da solução de lipase comercial de <i>C. rugosa</i> atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada	40
Figura 5.6: Concentrações de ácidos ao longo do tempo de hidrólise da manteiga utilizando-se solução de lipase comercial de <i>C. rugosa</i>	40
Figura 5.7 – Microrganismos presentes no inóculo advindo do reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais tratando efluente de laticínios	41
Figura 5.8 – Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de manteiga	42

Figura 5.9 – Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de esterco bovino e gordura hidrolisada com preparado enzimático de <i>G. Candidum</i>	43
Figura 5.10 – Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de manteiga hidrolisada com enzima de <i>C. rugosa</i>	44
Figura 5.11 – Velocidade de produção de biogás obtidas nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia realizados	45
Figura 5.12: Valores de atividade enzimática de solução preparado enzimático de <i>C. rugosa</i> atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada nos ensaios após biodegradação anaeróbia	48
Figura 5.13: Valores de atividade enzimática de solução preparado enzimático de <i>C. rugosa</i> atuando sobre manteiga na faixa de temperatura estudada nos ensaios após biodegradação anaeróbia	49
Figura 5.14 – Micromoles de ácidos formados ao longo do tempo com pH 7,5 e temperatura de 40°C	50
Figura 5.15 – Resultado da análise dos efeitos da relação de g de gordura por g de enzima da lipase comercial de <i>C. rugosa</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Dados da construção da curva-padrão para produção de ácido oleico	31
Tabela 4.2 – Composição da solução de Micronutrientes utilizada nos ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia	31
Tabela 4.3 – Composição da solução de Macronutrientes utilizada nos ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia	32
Tabela 4.4 – Detalhamento do ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia	33
Tabela 4.5 – Variação nas concentrações de manteiga utilizadas para estudo do desempenho da enzima <i>C. rugosa</i> no que se refere à produção de ácidos graxos obtidas em frascos reatores com mesma atividade enzimática	33
Tabela 5.1 – Caracterização dos substratos utilizados o ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia	36
Tabela 5.2 – Produção líquida de metano, coeficiente de conversão $Y_{p/s}$ e produção específica de metano em relação à quantidade fornecida de DQO e gordura em cada ensaio	46
Tabela 5.3 – Relação entre produto e substrato das concentrações de gordura estudadas	51

LISTA DE ABREVIACÕES

AGCL – Ácidos Graxos de Cadeia Longa

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

AME – Atividade Metanogênica Específica

BA – Biodegradabilidade Anaeróbia

DCT – Detector de Condutividade Térmica

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EETE – Estação Experimental de Tratamento de Efluentes

FZEA/USP – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

FOG – Gorduras, óleos e ácidos graxos

O&G - Óleos e Gorduras

PBR – Reator de Leito Híbrido

STV – sólidos totais voláteis

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

UASB – Reator de Leito Imobilizado com Fluxo Ascendente

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de resíduos agroindustriais se constitui em grande desafio. Dadas às normas de conduta ambientais vigentes atualmente, nos últimos anos os setores industrial e agrícola passaram a assumir nova postura em relação ao manejo de seus dejetos. Isso resultou na implantação do conceito de desenvolvimento sustentável, ou seja, diminuição da geração de resíduos com possibilidades de reutilização ou reaproveitamento.

Na busca da minimização do impacto causado pela inadequada disposição de resíduos, tem-se empregado tecnologias inovadoras de tratamento. A seleção da tecnologia depende das características do resíduo e da qualidade ou destino que se deseja para o produto final.

Dentre as tecnologias empregadas para a estabilização de resíduos, a digestão anaeróbia é uma prática atrativa na qual controle da poluição e recuperação de energia podem ser alcançados (CHEN *et al.*, 2008). Segundo Kapdi *et al.* (2004), o biogás resultante do tratamento anaeróbio é um combustível ambientalmente limpo, barato e versátil. Na composição bruta do biogás está contido cerca de 55-65% de gás metano (CH_4), 30-45% de dióxido de carbono (CO_2), traços de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e frações de vapor de água.

Resíduos provenientes de laticínios, matadouros, indústria de processamento de aves, processos de extração e de beneficiamento de óleos, por exemplo, apresentam elevados teores de lipídeos. A poluição da água por óleos é especialmente nociva à vida aquática, porque diminui a penetração de luz e perturba o mecanismo de transferência de oxigênio provocando a morte de seres aquáticos.

Os lipídeos contidos nesses efluentes, além de representarem uma perda industrial importante, interferem negativamente nos sistemas de tratamento de efluentes (MENDES *et al.*, 2005). Elevadas concentrações de lipídeos resultam na formação de lodos com reduzida atividade hidrolítica (ALVES *et al.*, 2009) fazendo com que haja necessidade de aumento do tempo de retenção hidráulica nas lagoas de estabilização, além de aumentar a demanda por produtos flocculantes (MENDES *et al.*, 2005) e entupimento de leitos fixos.

Em função de apresentarem baixa solubilidade em água, a acessibilidade dos lipídios é também reduzida. A baixa acessibilidade faz com que tais moléculas permaneçam por mais tempo nos sistemas de tratamento, maximizando seus efeitos negativos. Para resolver esse problema dos lipídeos, alguns autores realizam processos de pré-hidrólise, por meio de ações de enzimas, principalmente lipases. Segundo MENDES *et al.*, (2005), a utilização de lipases reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, possibilitando melhores condições de operação de sistemas biológicos e a desobstrução de tubulações, aumentando assim, a vida

útil dos equipamentos. Dentre os produtos da hidrólise, todavia, além de glicerol (facilmente convertido), ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são formados, sendo tais compostos tóxicos a importantes microrganismos anaeróbios.

Alves *et al.*, (2009), afirmam que até o momento, efluentes contendo altas concentrações de lipídeos não foram efetivamente tratados em reatores anaeróbios de alta taxa, comentando que a produção de metano a partir de tais substratos ou seus intermediários ainda é um desafio. A alternativa muitas vezes praticada é a remoção prévia dos lipídeos antes da entrada do efluente nos reatores de alta taxa. Após sua retirada, tais compostos podem servir de importante fonte de carbono para a produção de metano.

Assim sendo, o presente estudo avaliou a degradação anaeróbia de substrato modelo simulando efluente gorduroso de laticínios. Para a degradação das gorduras foram aplicados dois tratamentos enzimáticos com mecanismos de ação diferentes, a fim de verificar se a presença de processo de pré-hidrólise afeta o processo anaeróbio e se a produção de biogás pode ser relacionada com o mecanismo de ação da enzima utilizada.

2. OBJETIVOS

Avaliar a influência de dois tipos de pré-tratamentos enzimáticos, lipase comercial de *Candida rugosa* e o preparado enzimático de *Geotrichum candidum*, na digestão anaeróbia de gorduras do leite.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de biogás advinda de gorduras hidrolisadas e *in natura*;
- Determinar condições ótimas de processo (pH e temperatura) da hidrólise de gorduras do leite utilizando-se enzimas de *Geotrichum candidum* e *Candida rugosa*;
- Determinar o tempo necessário para hidrólise de gorduras do leite utilizando-se de enzimas de *Geotrichum candidum* e *Candida rugosa*;
- Estudar e avaliar a relação substrato/enzima na hidrólise de gorduras do leite.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodigestão Anaeróbia

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. A eficiência dos microrganismos na ciclagem dos elementos químicos nos sistemas naturais está alicerçada em parâmetros como: abundância, diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica bem como de adaptação às condições adversas do meio (KATAOKA, 2001). Uma substância ou um composto é biodegradável se ele pode ser decomposto por ação de microrganismos (ANGELIDAKI & SANDERS, 2004). Sendo assim, técnicas de tratamento de resíduos baseados na biodegradação, tais como a biodigestão anaeróbia, são preferencialmente utilizadas.

Dentre as principais vantagens do tratamento anaeróbio, podem ser citadas o baixo custo de implantação e operação, tolerância a elevadas cargas orgânicas, operação com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de retenção hidráulica, (AQUINO & CHERNICHARO, 2005). Além disso, pode-se citar o baixo consumo energético por não exigir introdução de oxigênio no meio como nos processos aeróbios, baixa produção de lodo e, finalmente, possibilidade de recuperação e utilização de gás metano como combustível (FORESTI, 1994). Já as desvantagens estão relacionadas à dificuldade de remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo e patógenos, e na sensibilidade do processo às mudanças das condições ambientais (AQUINO & CHERNICHARO, 2005). O tratamento anaeróbio envolve processos metabólicos complexos, que ocorrem em etapas sequenciais e dependem da atividade de no mínimo três grupos de microrganismos distintos: bactérias fermentativas ou acidogênicas, bactérias sintróficas ou acetogênicas e microrganismos metanogênicos (AQUINO & CHERNICHARO, 2005).

As etapas sequenciais do processo anaeróbio são acidogênese, acetogênese e metanogênese detalhadas a seguir:

- I. Acidogênese: A matéria orgânica complexa é hidrolisada. Bactérias acidogênicas fermentam monômeros orgânicos resultantes da hidrólise produzindo ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico). Segundo Aquino & Chernicharo, (2005), como os microrganismos fermentativos não dispõem, em condições anaeróbias, de um aceptor final de elétrons como o oxigênio, os ácidos orgânicos são reduzidos a acetato, propionato e butirato além de formiato, etanol, dióxido de carbono e hidrogênio.

- II. Acetogênese: Microrganismos sintróficos produzem acetato, hidrogênio e dióxido de carbono a partir de propionato e butirato. Ambos compostos não são substratos para as bactérias metanogênicas, daí sua importância ao processo. Os sintróficos são assim chamados devido a sua dependência de outro grupo de microrganismos, os hidrogenotróficos, consumidores de hidrogênio.
- III. Metanogênese: Realizada pelos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, eles convertem acetato em gás metano. O metano também pode ser produzido a partir da redução de dióxido de carbono ou formiato pelos microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos.

3.2. Lipídeos como inibidores do tratamento anaeróbio

Os lipídeos encontram-se, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis e uma pequena parte de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) tais como o ácido palmítico, esteárico, linoleico e oleico, sendo esse último o mais abundante. Óleos e gorduras são contaminantes presentes em esgoto doméstico, efluentes industriais, matadouros e laticínios (MENDES *et al.*, 2005).

Em relação aos resíduos sólidos, os principais problemas são relacionados à baixa biodisponibilidade dos lipídeos e também à inibição devido à presença de AGCL. A inibição das atividades das bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas são os problemas mais citados em função da presença de lipídeos no tratamento anaeróbio de resíduos (ALVES *et al.*, 2009; HWU *et al.*, 1998). Hwu *et al.* (1996) citam ainda a dificuldade no transporte de nutrientes para dentro das células, ocorrida em relação da adsorção de AGCL como outro problema encontrado. Segundo Mendes *et al.* (2005) todavia, uma vez dentro das células, os AGCL são incorporados a complexos lipídicos, como a membrana plasmática. Uma vez no interior das células, bactérias fermentativas convertem esses intermediários a acetato, propionato e butirato ou outros ácidos graxos voláteis (AGV), hidrogênio e gás carbônico. As bactérias acetogênicas podem converter AGCL e outros AGV a ácido acético.

Segundo Koster e Cramer, (1987), dentre os AGCL, o ácido oléico é mais inibidor do que o ácido láurico e o caprílico levemente inibidor. Pereira *et al.* (2002) bem como Neves *et al.* (2009) observaram que o ácido palmítico tem tendência a se acumular em reatores anaeróbios, podendo este ser intermediário chave na degradação anaeróbia de lipídeos. Hwu *et al.* (1996) concluíram que a toxicidade dos AGCL varia com o tipo de lodo anaeróbio,

sendo mais relacionada com as características físicas do lodo (área de superfície específica e tamanho do agregado) do que com as características biológicas. Lodos suspensos e floculados, os quais apresentaram maior superfície de contato, sofreram maior inibição do que os granulados. Em relação à temperatura, as bactérias termofílicas metanogênicas foram mais sensíveis à biodegradação de AGCL do que os microrganismos metanogênicos em ambientes mesofílicos.

Dentre os mecanismos para controle da inibição microbiana, Chen et al. (2008) citam que a adaptação dos microrganismos ao composto é fator preponderante na otimização do processo. Nesse sentido, Cavaleiro *et al.* (2009) concluíram que a exposição dos microrganismos à bateladas subsequentes de substrato contendo ácidos de cadeia longa promoveu a adaptação requerida da biomassa, que ficou apta a receber tal substrato continuamente, com produção de biogás estável.

Na remoção dos lipídeos em estado livre, geralmente são utilizadas as caixas de gordura comuns que permitem sua separação por retirada manual ou por meio de raspadores de superfície. A flotação forçada, com ou sem adição de polímeros é outra possibilidade de remoção de gorduras, todavia apesar da eficiência de remoção melhorar significativamente, tal processo apresenta custos operacionais elevados, além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada (MENDES *et al.*, 2005). Segundo Alves *et al.* (2009) 1g de gordura produz 1,425 L de biogás na sua decomposição sendo este composto por 68,5% de metano. Percebe-se, assim, que um grande potencial de biogás pode estar sendo desperdiçados em ações de remoção física de gorduras. Em nossos estudos, a remoção da gordura seria descartada, mas o acréscimo de enzima poderia aumentar o custo do tratamento, entretanto, dependendo do valor de atividade enzimática por grama de enzima utilizada, não tal custo excedente não ocorreria.

3.3. Aplicação de lipases como auxiliares na degradação de lipídeos

Como alternativa à remoção prévia de óleos e graxas, lipases são muito empregadas no pré-tratamento de efluentes gordurosos. As lipases podem ser utilizadas na forma bruta (caldo fermentado) ou purificadas.

Enzimas são catalizadores biológicos e seu uso no tratamento de águas residuárias apresenta muitas vantagens tais como simplicidade e facilidade no controle do processo, ausência de necessidade de períodos de aclimação e a não existência de efeito de choque por

carga de poluentes (MENDES *et al.*, 2005). As enzimas são aplicadas em efluentes de alta ou baixa concentração orgânica e operam em amplas faixas de pH e temperatura.

A lipase produzida por *Candida rugosa* foi objeto de estudo de Pereira *et al.*, (2003) no tratamento de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, sendo que a utilização do tratamento enzimático resultou em redução de 33% no tempo de digestão anaeróbia.

Mendes *et al.*, (2006) usaram pancreatina para a pré-hidrólise, de efluentes de laticínios e procederam sua degradação em batelada por via anaeróbia. Quando comparados com efluentes não hidrolisados, os ensaios tratados com pancreatina mostraram maior velocidade de conversão e maiores volumes de biogás produzidos.

Gomes *et al.* (2011) todavia, encontraram inibição severa quando submeteram um reator anaeróbio à alimentação contínua com efluente gordurosos hidrolisado com pancreatina, assim como Siguemoto *et al.* (2009) estudando um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais alimentado com efluente de laticínio hidrolisado com enzima de *C. rugosa*.

Leal *et al.* (2002) obtiveram um extrato enzimático de alta atividade lipídica com extrato produzido de *Penicillium restrictum* usando babaçu como substrato. O extrato foi usado na hidrólise de efluente contendo altos teores de lipídeos 180, 450, 900 e 1.200 mg.L⁻¹. Após diferentes condições de hidrolises serem testadas, determinou-se a temperatura de 35°C com agitação, 10% v/v de extrato enzimático por 12 horas agindo sobre as diferentes concentrações de substrato. Ambos efluentes, cru e hidrolisado, foram submetidos a tratamento anaeróbio. Os autores observaram elevada eficiência no tratamento anaeróbio com prévio tratamento enzimático sendo que o efluente de maior teor lipídico, 1.200 mg.L⁻¹, obtiveram uma eficiência de 19 e 80% quando tratados sem e com tratamento hidrolítico respectivamente. Assim, para os autores, os resultados obtidos ilustraram a viabilidade do uso de um tratamento híbrido (enzima biológica) para efluentes contendo altos teores de lipídeos.

Jeganathan *et al.* (2007) a fazendo uso de pré tratamento enzimático realizado em reator de leito fixo, com enzimas imobilizadas em alginato de sódio, seguido de reator do tipo UASB (upflow anaerobic sludge blanket) realizou um tratamento de água residuária de indústria de alimentos de animais, pet food, rica em óleos e gorduras (O&G) aplicando diferentes tempos de retenção hidráulica ao sistema. As condições do pré tratamento aplicado foram pH de 7,2 e temperatura de 35 °C. Durante a operação contínua do sistema, houve fornecimento contínuo de lipase de *C. rugosa* imobilizada, devido à perda de atividade da enzima e ruptura das matrizes de alginato. A pré-hidrólise de óleos e gorduras em ácidos

graxos de cadeia longa livres no sistema reduziu flotação de biomassa no reator UASB permitindo a utilização de reduzidos tempos de detenção hidráulica,

O Quadro 3.1 lista diversos trabalhos realizados com a adição de lipases objetivando a melhora do tratamento anaeróbio de resíduos líquidos e sólidos gordurosos. Percebem-se diante de tanta diversidade de concentrações específicas (atividade enzimática/grama de gordura e concentração de substrato) bem como a de enzimas, diferentes mecanismos de hidrólise devem ser testados objetivando minimizar os processos inibitórios.

Quadro 3.1: Condições de processo de hidrólise de lipídeos em resíduos gordurosos agroindustriais.

Tempo (em horas)	Enzima	Atividade enzimática	Concentração da solução enzimática	Massa de Enzima/Massa de Gordura	Atividade Enzimática/Massa de Gordura	Substrato	Concentração de Gordura	Fonte
12	Lipase de <i>Penicillium restrictum</i>	2,1 U/mL	10% v/v	–	194,4 U/g – 1295 U/g	Efluente de Laticínio	180 – 1200 mg/L	Leal et al. (2002).
24	Lipase de <i>Penicillium restrictum</i> (sólida)	21,8 U/g	0,1% m/v	1 – 5 g/g	21,8g U/g – 109 U/g	Efluente Sintético de Laticínio	200 – 1000 mg/L	Leal et al. (2006)
24	Solução de Pancreatina	1,7 U/g	0,5% m/v	1,08 – 3,27 g/g	5,6 U/g – 39,8 U/g	Efluente de Laticínio	1530 – 4680 mg/L	Mendes <i>et al.</i> (2006)
24	Solução de Pancreatina	3,992 U/g	0,5% m/v	1,04 g/g	4,16 U/g	Efluente de Laticínio	4,68 g/L	Mendes <i>et al.</i> (2005)
6 – 12	Lipase de <i>Candida rugosa</i> em alginato de sódio	250 U/g	Reator de Leito Imobilizado	0,04 g de Solução Enzimática/	10 U/g	Pet Food	1,18 – 2,35 g/L	Jeganathan <i>et al.</i> (2007)a
5 – 10	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	–	Reator de Leito Imobilizado	0,04 g/g	-	Indústria de Processamento de alimentos	0,8 – 1,2 g/L	Jeganathan <i>et al.</i> (2006)
1 – 2	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	0,89 U/g	Reator de Leito Imobilizado	0,04 g/g	0,8 U/g	Pet Food	1,12 g/L	Jeganathan <i>et al.</i> (2007)b
4	Pancreatina bacteriana	–	200 – 1000 mg/L	0,08 – 0,4 g/g	–	Gordura Sólida (abate bovino)	2,5 g/L	Masse <i>et al.</i> (2001)
24	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	-	10% v/v	0,002 g/g	10 U/g	Gordura sólida de processamento de suínos	-	Cavaleiro <i>et al.</i> (2011)

3.4. Considerações finais da revisão bibliográfica

Percebeu-se que há grande variedade de enzimas utilizadas para a realização das hidrólises bem como grande amplitude do intervalo referente à relação enzima/substrato. Além disso, verificou-se também divergência em relação aos resultados obtidos referentes à digestão anaeróbia posterior à hidrólise enzimática de gorduras. Assim, o presente trabalho estudou a eficiência de duas enzimas de diferentes ações sendo uma éster-inespecífica, obtida de *Candida rugosa*, e a outra éster-específica, obtida de *Geotrichum candidum*, com objetivo de verificar se a produção de biogás pode ser relacionada com o mecanismo de ação da enzima utilizada. Por fim, realizou-se um estudo de eficiência enzimática em relação à concentração de substrato no intuito de melhorar desempenho dos reatores e reduzir os custos das operações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental

A Figura 4.1 descreve resumidamente o experimento realizado no presente trabalho salientando a sequência de atividades, ordenando-as cronologicamente.

Figura 4.1: Desenho esquemático do experimento realizado.

4.2. Caracterização do lodo anaeróbio

4.2.1. Inóculo

O inóculo utilizado no presente trabalho foi proveniente de reator anaeróbico operado em bateladas sequenciais componente da Estação Experimental de Tratamento de Efluentes – EETE Laticínio Escola PUSP-P. O reator operou por 5 anos com tempo de ciclo de 48 horas, e eficiência média de $87\% \pm 4\%$, tratando, a cada ciclo, 670L de efluente cuja concentração de matéria orgânica é em média $5454 \pm 1935 \text{ mg.L}^{-1}$, e a de lipídeos $240 \pm 37 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.2.2. Caracterização microbiana

4.2.2.1. Microscopia

Os microrganismos do inóculo foram submetidos a análises de microscopia de luz comum e fluorescência para a verificação da presença de microrganismos metanogênicos.

4.2.2.2. Atividade metanogênica específica

As análises de atividade metanogênica específica foram realizadas de acordo com Vazzoler (1989). A suplementação de minerais se deu de acordo com Zhender (1989). O biogás foi quantificado por transdução de pressão e sua composição analisada por cromatografia quanto à concentração de hidrogênio, nitrogênio, metano e gás carbônico. O cromatógrafo gasoso era equipado com detector de condutividade térmica (DCT), coluna Carboxen 1010 PLOT, 30m x 0,53mm. A temperatura do injetor foi de 220°C, com Hélio como gás de arraste. Foi utilizado fluxo na coluna de 5,66 mL/min, com temperatura do detector de 230 °C. A corrente foi de 35mA, com polaridade negativa. A temperatura aplicada no forno foi de 130 °C a 135 °C (5,5 mim), com rampa de 46 °C/mim. O cálculo do valor da AME (Atividade Metanogênica Específica) foi realizado através da derivada da curva obtida no período linear de produção metanogênica, que forneceu a velocidade de produção metanogênica, dividida pela massa de microrganismos usada nos ensaios (em sólidos totais voláteis – STV).

4.3. Determinação das condições ótimas de hidrólise

O processo de hidrólise da gordura presente na manteiga foi estudado com enzima comercial de *C. rugosa* que foi fornecida pela Sigma Aldrich, lote BCBC4793V, com atividade nominal de 5,95 U/mg, e com o preparado enzimático de *Geothricum candidum*. O preparado enzimático utilizado foi obtido de acordo com Silva (2012). Tal preparado foi advindo de caldo fermentado não purificado e liofilizado. Para retirar impurezas do preparado enzimático, após sua dissolução procedeu-se centrifugação a 1500 rpm por 6 mim. As atividades das soluções enzimáticas eram mensuradas a cada ensaio.

4.3.1. Determinação de atividade enzimática

4.3.1.1. Preparo e padronização da solução de KOH alcoólica a 0,05N

Seguindo orientações de Silva, (2012), dissolveu-se 35g de KOH em 20 mL de água destilada. Posteriormente completou-se o volume para 1 L com álcool etílico isento de aldeído para a obtenção de uma solução 0,5N. Foi retirada uma alíquota de 100 mL dessa solução e completou-se a 1 litro com álcool etílico. Para a padronização, pesou-se 0,1g de biftalato de potássio em um erlenmeyer de 125 mL e diluiu-se o sal em água destilada. Titulou-se o sal com a solução de KOH alcoólico 0,05N usando fenolftaleína como indicador. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.1.2. Construção da curva-padrão de ácido oleico

Pesaram-se 10 alíquotas de ácido oleico (Tabela 4.1) em erlenmeyers de 125 mL usando balança analítica. Determinou-se o volume de ácido presente no recipiente por meio da equação

$$V = \frac{m}{\rho}, \quad (\text{Equação 4.1})$$

em que V é o volume, m é a massa e ρ a densidade do ácido oleico.

Determinou-se então a quantidade de tampão fosfato (pH 7,0) a ser adicionada em cada amostras para completar o valor de 1mL (Tabela 4.1). Adicionou-se ao meio 5 mL da emulsão de óleo de oliva (1,25 mL) e goma arábica a 7% (3,75 mL). Adicionaram-se mais 2 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e procedeu-se a titulação de cada amostra com a solução de KOH alcoólico usando fenolftaleína como indicador. Com os volumes de KOH obtidos, construiu-se a curva-padrão de ácido oleico (Figura 4.2).

Tabela 4.1: Dados da construção da curva-padrão para produção de ácido oleico

Massa de ácido oléico em g	Volume de ácido oléico em mL	Volume de tampão em mL	Volume gasto de KOH em mL	Micromoles
0,0233	0,0262	0,9738	1	82,4866
0,0471	0,0529	0,9471	2,1	166,7434
0,0702	0,0789	0,9211	3,4	248,5220
0,0959	0,1077	0,8922	5,5	339,5051
0,1277	0,1435	0,8565	8,1	452,0834
0,1532	0,1721	0,8279	9,6	542,3585
0,1781	0,2001	0,7999	11	630,5094
0,2018	0,2267	0,7733	12,3	714,4121
0,2265	0,2545	0,7455	14,1	801,8551
0,2502	0,2811	0,7189	15,3	885,7578

Figura 4.2. Curva-padrão de ácido oleico com meio de reação formado por óleo de oliva e goma arábica utilizada nos cálculos para a determinação do tempo de processo de hidrólise de manteiga com as lipases do presente estudo.

4.3.2. Medida de atividade enzimática

Em um erlenmeyer de 125 mL foram preparados sistemas de reação compostos de 5 mL de emulsão composta por 3,75 mL de solução de goma arábica à 7% e 1,25 mL de óleo de oliva, 2 mL de solução tampão a 0,1M de pH 7,0 e 1 mL de solução enzimática. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação tipo Dubnoff. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de solução de acetona: etanol (1 : 1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05N utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma Unidade é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação (MACEDO, 1997). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.3. Determinação do pH ótimo

Foram preparadas soluções tampão nos seguintes valores: tampão acetato 0,1 M a diferentes valores de pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; tampão fosfato 0,1M a pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; tampão borato 0,1 M a pH 8,0; 8,5; 9,0. Em seguida, foi realizado o procedimento de leitura da atividade enzimática descrito em 4.3.2..

4.3.4. Determinação da Temperatura Ótima

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com a atividade enzimática das lipases, utilizando-se as temperaturas de incubação que variaram de 35°C a 45°C, com auxílio de banho termostatzado agitado. Essa faixa de temperatura foi baseada em resultados preliminares realizados para o preparado enzimático líquido de *G. candidum*, e em resultados obtidos por Macedo *et al.* (2009) e Mendes *et al.* (2006) quando se utilizou lipase de *C. Rugosa*.

4.3.5. Determinação do tempo de processo de hidrólise de manteiga com lipase comercial de *C. rugosa*

Foram adicionados a 18 erlenmeyers de 250 mL 0,7808g de manteiga, 16 mL de solução de lipase comercial de *Candida rugosa* – pH 6,5 – com atividade aproximada de 20 U/mL. A mistura foi incubada nas temperaturas de 37 a 41 °C, baseando-se em resultados obtidos do experimento descrito em item 4.3.4., em agitador orbital, retirando-se cada erlenmeyer nos intervalos de tempo pré-determinados: 0 horas (branco), 30, 60, 90 e 120 minutos, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas. Paralisou-se a reação nos tempos propostos com adição de 10 mL de solução de álcool : acetona na proporção 1:1. Os ácidos graxos liberados no processo de hidrólise foram titulados contra solução de KOH alcoólico 0,05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.6. Determinação do tempo de processo de hidrólise de manteiga com lipase comercial de *G. candidum*

A 18 erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 0,7808 g de manteiga, 16 mL de solução de lipase comercial de *Geotrichum candidum* – pH 7,5 – com atividade aproximada de 7 U/mL. A mistura foi incubada nas temperaturas de 40 °C, baseando-se em resultados obtidos do item 4.3.4., em agitador orbital, retirando-se cada erlenmeyer nos intervalos de tempo pré-determinados: 0 horas (branco), 30, 60, 90 e 120 minutos, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas. Paralisou-se a reação nos tempos propostos com adição de 10 mL de solução de álcool : acetona na proporção 1:1 v/v. Os ácidos graxos liberados no processo de hidrólise foram titulados contra solução de KOH alcoólico 0,05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.7. Otimização da hidrólise de gorduras utilizando lipase de *C. rugosa*

No intuito de otimizar a hidrólise utilizando-se a lipase com qual se obteve melhor desempenho, foram realizadas, seguindo a ordem de apresentação abaixo, as determinações:

- do pH ótimo dentro da faixa 3,5 a 9, seguindo a temperatura e tempo padrões da análise de atividade enzimática descrita em 4.3.3.. Tal determinação foi realizada três vezes, utilizando triplicatas para cada ensaio;
- da temperatura ótima dentro da faixa 25 a 70 °C sob pH 7,5 segundo análise dos resultados observados no item acima. Tal determinação foi realizada três vezes, utilizando triplicatas para cada ensaio;
- do tempo ótimo de hidrólise a 40 °C e pH 7,5 segundo resultados obtidos. Tal determinação foi realizada três vezes, utilizando triplicatas para cada ensaio;

do desempenho da enzima variando-se as concentrações de manteiga (Tabela 4.5) de 24,4 g/L a 268,4 g/L. Neste experimento foram utilizados os resultados de pH e temperatura obtidos no processo de otimização, realizado em quatro ensaios em triplicatas cada um. Os valores das concentrações utilizadas foram variados em torno do valor utilizado nos ensaios anteriores (48,8 g/L). A partir da metade deste valor, aumentou-se a concentração até que fosse verificada baixa variação nas concentrações de produtos obtidas.

Tabela 4.5: Variação nas concentrações de manteiga utilizadas para estudo do desempenho da enzima *C. rugosa* no que se refere à produção de ácidos graxos obtidas em frascos reatores com mesma atividade enzimática.

Concentrações de manteiga (g/L) reagindo com a mesma quantidade de solução enzimática de atividade média de 18U										
24,4	48,8	73,2	97,6	122	146,4	170,8	195,2	219,6	244	268,4

4.4. Análise de biodegradabilidade anaeróbia (BA)

O ensaio de biodegradabilidade anaeróbia foi realizado segundo a metodologia descrita em Cavaleiro *et al.* (2013) em frascos antibióticos de volume total de 100 mL. Adicionou-se aproximadamente 20 mL de lodo anaeróbio previamente adaptado a efluente de laticínio a cada frasco. Em volume de 40 mL adicionaram-se a fonte de carbono e a solução de sais de metais de acordo com Zhender (1989) (Tabela 4.2 e 4.3). A Tabela 4.4 descreve os valores dos volumes de biomassa, de suspensão de gordura (*in natura* e hidrolisada com as já citadas enzimas), de solução de micronutrientes e de solução de macronutrientes utilizados nos ensaios. A concentração da suspensão de gordura era de 48.8 g/L. Após a composição dos frascos, seus volumes úteis foram expostos a fluxo de N₂ até ser observada a descoloração da ressazurina, indicando anaerobiose. Os frascos então foram fechados com rolha de butila e selados com lacre de alumínio. A produção de biogás foi analisada por transdução de pressão e a concentração de metano analisada em cromatógrafo gasoso. O volume de biogás foi inferido de acordo com a curva padrão na Figura 4.3, realizada em triplicata em frascos com mesmo *head space* que os utilizados no ensaio.

Tabela 4.2: Composição da solução de Micronutrientes utilizada nos ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia

Componente	Concentração (g/L)
FeCl ₂ .6H ₂ O	2,00
H ₃ BO ₃	0,05
ZnCl ₂	0,05

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,038
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.09
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,00
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,092
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,164
EDTA	1
Resazurina	0.2
HCl 37%	1 mL/L

(Zehnder et al., 1980)

Tabela 4.3: Composição da solução de Macronutrientes utilizada nos ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia

Componente	Concentração (g/L)
NH_4Cl	17,0
KH_2PO_4	3,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,0

(Zehnder et al. 1980)

Tabela 4.4: Detalhamento do ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia

Frasco	Biomassa STV: 14,2 g /L (mL) – Médias entre as triplicatas	Solução de esterco - 20 g /L (mL)	Quantidade de solução de gordura 48,8 g/L (mL)	Água	Macro nutrientes (mL)	Micro nutrientes (mL)
Branco	20,305	0	0	39,7	0,2	0,1
Padrão	20,008	20	0	19,7	0,2	0,1
G*	20,029	20	5	14,7	0,2	0,1
GG*	20,022	20	5	14,7	0,2	0,1
GC*	20,138	20	5	14,7	0,2	0,1

*G - Frasco contendo gordura

*GG - Frasco contendo Gordura hidrolisa com preparado enzimático de *G. candidum*.

*GC - Frasco contendo gordura hidrolisada com solução de *C. rugosa*.

Figura 4.3: Curva padrão do transdutor de pressão utilizado no primeiro ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia.

4.5. Determinação da toxicidade

Este ensaio foi realizado com metodologia adaptada de Hwu e Lettiga (1997) nos frascos que receberam gordura hidrolisada, para a verificação de possível inibição sob os microrganismos metanogênicos acetoclásticos, causada por exposição a ácidos graxos de cadeia longa. Injetou-se 1 mL de solução 0,8 M de acetato de sódio, o que forneceu em massa a mesma quantidade da fonte de carbono utilizada nos ensaios de AME. A produção de biogás foi analisada por transdução de pressão e a concentração de metano analisada em cromatógrafo gasoso. O cálculo do valor da AME foi realizado através da derivada da curva obtida no período linear de produção metanogênica, que forneceu a velocidade de produção metanogênica, dividida pela massa de microrganismos usada nos ensaios (em STV).

4.6. Análises físico-químicas

A concentração de matéria orgânica foi expressada através da análise da demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total Kjeldahl (TKN-N) e concentração de sólidos todos medidos de acordo com a metodologia descrita em Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/WEF, 1998).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos resíduos e substratos

Na caracterização do esterco obteve-se o valor de 48 mg/g para a Demanda Química de Oxigênio determinadas em amostras brutas (DOO_T), 13 mg/L para a Demanda Química de Oxigênio determinadas em amostras filtradas (DQO_F), Sólidos Totais 132,2 mg/L, NTK 18 mg/g e 3,4 mg/g de gordura.

Foram então conduzidos ensaios para determinação de condições ótimas de hidrólise, referentes a pH, temperatura e tempo de processo. Determinados tais parâmetros, (apresentados posteriormente), caracterizaram-se seus produtos de hidrólise, em relação à concentração de matéria orgânica.

A Tabela 5.1 apresenta tais resultados após a adição de manteiga e das enzimas, e mostra que houve diminuição de 38% de DQO quando se comparam os valores obtidos para a solução de manteiga e para o hidrolisado com enzima de *G. candidum*. Tal fato é muito interessante, uma vez que esta enzima foi produzida no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FZEA/USP, pelo mestre Guilherme S Silva, que após a obtenção do caldo fermentado, não o purificou, tendo somente procedido a sua liofilização. Ao que tudo indica os microrganismos presentes na amostra utilizada para a preparação da solução enzimática encontraram ambiente favorável para crescimento e consumiram parte da DQO. Tal fato é corroborado pela concentração de proteínas obtida no produto hidrolisado, maior que o obtido nas amostras de manteiga e nas amostras hidrolisadas por enzima de *C. rugosa*. Não foi verificada diminuição considerável de DQO nas amostras hidrolisadas por enzima comercial de *C. rugosa*, diferente do verificado por Mendes *et al.* (2006).

Tabela 5.1: Caracterização dos substratos utilizados o ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia.

Material	DQO _T [*]	NTK (mg/g)	Gordura (mg/g)
G	84 g/L	0,5	813
GG	52 g/L	4,1	621
GC	81g/L	0,7	789

DQO_T – Demanda química de oxigênio determinada em amostras brutas.

G – manteiga

GG – manteiga hidrolisada por solução enzimática de lipase de *G. candidum*

GC – manteiga hidrolisada por solução enzimática de lipase de *C. rugosa*

5.2. Caracterização enzimática

Nos subitens a seguir serão apresentados os resultados advindos da caracterização enzimática realizada com intuito de determinar as condições ótimas de trabalho das lipases de *G. candidum* e *C. rugosa* atuando em gorduras da manteiga.

5.2.1. Enzima de *Geotricum candidum*

A Figura 5.1 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos com a variação de temperatura estudada. A faixa foi escolhida baseando-se em Silva (2012), que caracterizou a enzima de *G. candidum*, atuando em óleo de oliva como substrato. Percebeu-se que a temperatura ótima de atuação da enzima se deu em 40° C, assim como verificado por Silva (2012), utilizando óleo de oliva como substrato.

Figura 5.1. Valores de atividade enzimática do preparado enzimático líquido de *G. candidum* atuando sobre manteiga na faixa de temperatura estudada.

A Figura 5.2 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos com a variação de pH na faixa estudada. Percebeu-se que, o maior valor de atividade enzimática se deu em pH de valor 7,5.

Figura 5.2: Valores de atividade enzimática do preparado enzimático líquido de *G. candidum* atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada.

Determinadas as condições ótimas de pH e temperatura, estudou-se o tempo de processo necessário para a obtenção da maior concentração de acidez total nas amostras hidrolizadas. A Figura 5.3 mostra os valores de concentrações de produto obtidos, em que pode verificar produção de ácidos até a 8ª hora de processo, seguida de consumo, provavelmente realizado pelos microrganismos presentes no preparado enzimático.

Figura 5.3: Concentrações de ácidos ao longo do tempo de hidrólise da manteiga utilizando-se preparado enzimático de *G. candidum*.

O tempo escolhido para o processo de hidrólise utilizando-se preparado enzimático de *G. candidum* foi de 8h.

5.2.2. Enzima de *Candida rugosa*

A Figura 5.4. mostra os resultados de atividade enzimática obtidos com a variação da temperatura de processo de hidrólise com enzima de *C. rugosa*. A faixa de temperatura escolhida foi baseada em recomendações do fornecedor (Sigma Aldrich) e em resultados obtidos por Macedo *et al.* (2009) que estudaram a hidrólise de efluentes de laticínios utilizando lipase de *C. rugosa* produzida utilizando-se soro de queijo como substrato.

Figura 5.4: Valores de atividade enzimática de solução de lipase comercial de *C. rugosa* com manteiga como substrato, com a variação da temperatura na faixa estudada.

Foi possível verificar que a temperatura ótima de atuação da enzima foi 40°C, diferente do verificado por Macedo *et al.* (2009) que obtiveram atividade ótima em 45°C e Mendes *et al.* (2006) que observaram temperatura ótima de 37°C.

A Figura 5.5 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos com a variação do pH. Foi possível verificar que o pH de 6,5 foi o ótimo, diferente do especificado pelo fornecedor, que indica a utilização de pH 7,0 quando o óleo de oliva foi utilizado como substrato. O valor aqui obtido é também diferente do praticado por Mendes *et al.* (2006), que verificou valor 8,0 como pH ótimo.

Figura 5.5: Valores de atividade enzimática da solução de lipase comercial de *C. rugosa* atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada.

Determinadas as condições ótimas de trabalho, verificou-se a produção de ácidos graxos voláteis livres ao longo do tempo com quatro temperaturas próximas à ótima. A Figura 5.6 mostra os resultados obtidos ao longo do tempo.

Figura 5.6: Concentrações de ácidos ao longo do tempo de hidrólise da manteiga utilizando-se solução de lipase comercial de *C. rugosa*.

Os dados apresentados na Figura 5.6 mostram ainda que para 40°C o tempo ótimo de hidrólise foi de 16 horas.

5.4. Ensaio comparativo de biodegradabilidade anaeróbia de gorduras do leite in natura e hidrolisadas por enzima de *G. candidum* de *C. rugosa*

5.4.1. Caracterização da biomassa

O inóculo mostrou abundância de morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp além de cocos e bacilos não fluorescentes (Figura 5.7 A e B). A concentração média de sólidos totais voláteis na amostra foi 8,5 g.L⁻¹. A atividade metanogênica específica foi de 5,8 mL de metano/gSSV.h. Não foi verificada a presença de microrganismos fluorescentes.

(A)

(B)

Figura 5.7: Microrganismos presentes no inóculo advindo do reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais tratando efluente de laticínios.

5.4.2. Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia

Procedeu-se a hidrólise da manteiga de acordo com o descrito nos itens 4.3.5. e 4.3.6. do material e métodos. A atividade enzimática do preparado enzimático líquido de *G. candidum* foi de 29,3 U/mL e a atividade enzimática da solução de lipase de *C. rugosa* foi de 39 U/mL. Após a hidrólise obteve-se a produção de 37 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e 26 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ quando a gordura foi hidrolisada com preparado enzimático líquido de *G. candidum* e com solução de *C. rugosa* respectivamente. Assim, adição de ácidos graxos totais foi de 44 μm , 187 μm , 133 μm , 5 mL de solução de manteiga, manteiga hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum* e manteiga hidrolisada com solução de lipase *C. rugosa*, respectivamente.

A Figura 5.8 apresenta a produção de biogás obtida no ensaio utilizando-se manteiga e esterco como fonte de carbono. É possível visualizar dois patamares na curva de produção de biogás, comportamento também verificado por Cavaleiro *et al.* (2013) em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia nos quais as fontes de carbono foram dois resíduos sólidos gordurosos advindos do abate de suínos. Quando trabalhando com efluentes de laticínios hidrolisados e não hidrolisados Mendes *et al.* (2006) não verificaram comportamento semelhante, o que possivelmente pode ser explicado pela diferença da concentração de gordura presente em tais ensaios, inferior a usada no presente estudo.

Figura 5.8: Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de manteiga.

A Figura 5.9 apresenta a produção de biogás obtida no ensaio utilizando-se manteiga hidrolisada com preparado enzimático líquido de *G. candidum* e esterco como fonte de carbono. Foi possível novamente visualizar dois patamares na curva de produção de biogás, todavia mais suaves. Tal comportamento é condizente com o fato da enzima de *G. candidum* ser éster específica, e promover hidrólise parcial da gordura. O volume acumulado de biogás produzido foi inferior ao verificado no ensaio quando a gordura foi fornecida in natura, indicando que possivelmente, a ocorrência de processo inibitório.

Figura 5.9: Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de esterco bovino e gordura hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum*.

A Figura 5.10 apresenta a produção de biogás obtida no ensaio utilizando-se manteiga hidrolisada com enzima de *C. rugosa*. Diferente dos dois ensaios apresentados previamente, a produção de biogás verificada no ensaio com gordura hidrolisada com enzima de *C. rugosa* não apresentou nenhum patamar intermediário antes da produção máxima mensurada. Tal fato indica que os patamares observados anteriormente foram devidos à necessidade de hidrólise por parte do consórcio microbiano anaeróbico, o que inclusive, acabou por retardar a produção metanogênica.

Figura 5.10: Produção de biogás ao longo do tempo quando a fonte de carbono foi proveniente de manteiga hidrolisada com enzima de *C. rugosa*.

A Figura 5.11 apresenta as regressões lineares realizadas na produção média de metano obtida no intervalo de 15 a 45 horas de ensaio. O valor de 15 horas foi determinado pois verificou-se presença de ténue fase de adaptação quando o substrato foi composto por gordura hidrolisada. Tais análises permitiram verificar que o maior valor de velocidade inicial de produção de biogás ocorreu no ensaio com manteiga hidrolisada com enzima comercial de *C. rugosa*, seguido do valor obtido no ensaio com manteiga hidrolisada com preparado enzimático líquido de *G. candidum*, seguido finalmente pelo valor obtido no ensaio com gordura *in natura*. Os valores das velocidades iniciais de biogás obtidos foram $1,60 \text{ mL.h}^{-1}$, $0,93 \text{ mL.h}^{-1}$ e $0,54 \text{ mL.h}^{-1}$ nos ensaios com gordura hidrolisada com enzima comercial de *C. rugosa*, gordura hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum* e gordura *in natura*, respectivamente.

Em relação à presença de fase lag, resultados semelhantes foram observados por Cavaleiro *et al.* (2013), com concentrações de gordura semelhantes às aqui utilizadas. Tal período de adaptação, todavia, foi pequeno e ténue, o que pode ser explicado pela origem da biomassa utilizada no presente estudo ser um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais tratando efluentes de laticínios sem remoção efetiva de gordura antes do reator. Segundo Pereira *et al.* (2005), bateladas sequenciais são a melhor forma de adaptação de

biomassa anaeróbia à presença de ácidos graxos de cadeia longa, fazendo com que o consórcio seja hábil a produção metanogênica sem fase *lag*.

Figura 5.11: Velocidade de produção de biogás obtidas nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia realizados – gordura hidrolisada com enzima de *C. rugosa* (▲); gordura hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum* (■) e gordura *in natura* (◆)

A Tabela 5.2 apresenta os dados de produção metanogênica máxima líquida mensurados nos ensaios. A produção metanogênica máxima líquida foi calculada descontando-se os volumes mensurados nos frascos denominados brancos. Observou-se que o frasco padrão apresentou produção metanogênica semelhante ao branco, algumas vezes aquém. Tal fato pode ter ocorrido em função da não adaptação da biomassa pelo material fornecido ou à baixíssima quantidade de matéria orgânica expressa em DQO fornecida através desse substrato.

5.2: Produção líquida de metano, coeficiente de conversão $Y_{p/s}$ e produção específica de metano em relação à quantidade fornecida de DQO e gordura em cada ensaio

Ensaio	Produção líquida de CH ₄ (mL)*	DQO (g)	Gordura (g)	$Y_{p/s}$ (mL CH ₄ /g DQO)	Produção específica (mL CH ₄ /gSSV)
Padrão	0	0,02	0	0	0
G*	103 ± 1,5	0,416	0,243	249	367,8
GG*	64 ± 2,1	0,264	0,186	243	228,6
GC*	190 ± 14,6	0,403	0,235	458	678,57

*G - Frasco contendo gordura

*GG - Frasco contendo Gordura hidrolisa com preparado enzimático de *G. candidum*.

*GC - Frasco contendo gordura hidrolisada com solução de *C. rugosa*.

As produções líquidas a partir das diferentes gorduras fornecidas foram diferentes, todavia quando se calculou o fator de conversão de substrato (volume de CH₄ dividido por g de DQO fornecida em produto, $Y_{p/s}$, Equação 5.1), percebeu-se que o único ensaio a com valores visivelmente maiores foi o realizado com gordura hidrolisada com enzima de *C. rugosa*.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{volume de CH}_4}{\text{gDQOfornecida}} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Os ensaios com gordura *in natura* e com gordura hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum*, não apresentaram diferenças significativas nos valores de $Y_{p/s}$, e tais valores foram aquém do teórico esperado, que segundo Speece (1996), na temperatura ensaiada seria de 395 mLCH₄/g DQO, caso toda a DQO fornecida tivesse sido convertida. Os valores de Biodegradabilidade Anaeróbia (Equação 5.2) calculados para gordura *in natura* e para a gordura hidrolisada por *G. candidum* foram de 63% e 62%, respectivamente. É importante comentar que ao final dos dois ensaios discutidos não se verificou acidez total significativa na fase líquida, todavia, percebeu-se a presença de material sólido flotante de coloração acinzentada. Infelizmente tentou-se realizar metodologia descrita por Neves *et al.*

(2009), porém não se obtiveram resultados confiáveis na determinação de ácidos de cadeia longa nas citadas amostras sólidas.

$$\text{Biodegradabilidade Anaeróbia} = \frac{\text{volume de CH}_4\text{obtido}}{\text{volume de CH}_4\text{esperado}} \text{ (Equação 5.2)}$$

O ensaio com gordura hidrolisada de *C. rugosa* evidenciou fator de conversão $Y_{p/s}$ 16% superior ao esperado, mostrando que é possível que a enzima de *C. rugosa* tenha degradado material gorduroso contido na biomassa de inóculo, ou mesmo material celular.

Em função da mesma quantidade de biomassa ter sido utilizada e diferentes valores de DQOs terem sido fornecidos, a produção metanogênica específica, calculada de acordo com a equação 5.3, apresentou valores significativamente diferentes para todos os ensaios. Todavia, deve-se considerar que os valores de DQO fornecidos para os ensaios com gordura *in natura* e gordura hidrolisada com enzima de *C. rugosa* foram semelhantes. A produção metanogênica específica quando a fonte de carbono foi gordura hidrolisada por *C. rugosa* foi 4,3 maior que a observada quando fornecido gordura *in natura*. Tal fato permite a conclusão de que, a pré-hidrólise com enzima de *C. rugosa* é muito interessante quando se deseja produzir biogás a partir de gorduras do leite.

$$\text{Produção Metanogênica Específica} = \frac{\text{volume máximo de CH}_4\text{obtido}}{\text{SSV}}, \text{ (Equação 5.3)}$$

em que SSV é a massa de sólidos suspensos voláteis utilizada no ensaio.

5.5. Ensaio de verificação de toxicidade

O presente ensaio foi realizado para verificação de inibição causada pelos AGCL na biomassa utilizada, uma vez que elevadas concentrações de gordura foram utilizadas nos ensaios. Os valores de AME obtidos foram 1,99 mLCH₄/h.g SSV nos frasco onde a gordura

foi hidrolisada por enzima de *C. rugosa* e 1,71 mLCH₄/h.g SSV nos frasco onde a gordura foi hidrolisada por enzima de *G. candidum*. Verificou-se que houve diminuição de 66% da AME nos frascos nos quais se hidrolisou a gordura com enzima de *C. rugosa* e de 71% da AME nos frascos hidrolisou-se a gordura com preparado enzimático de *G. candidum*.

Considerando os volumes reacionais do sistema (60 mL), a concentração de ácidos graxos totais foi de 0,73 mM, 3,1mM e 2,2mM quando se utilizou gordura *in natura*, e gordura hidrolisada com preparado enzimático de *G. candidum* e *C. rugosa* respectivamente.

Apesar da presença de inibição, deve-se salientar que se a produção de biogás for realizada em biodigestor do tipo batelada produzindo biogás e biofertilizante, a diminuição da atividade metanogênica específica não representará problema. Ensaio em batelada alimentada devem ser realizados para verificar se a exposição continuada da biomassa aos ácidos de cadeia longa advindos dos substratos utilizados, nas concentrações praticadas provocará prejuízo definitivo na produção metanogênica ou adaptação do sistema.

5.6. Variação da concentração de substrato na formação de produtos de hidrólise da manteiga

Em função de longo período de estocagem da enzima, e apesar do reagente encontrar-se dentro do prazo de validade, foram realizados novamente três ensaios de verificação de valores ótimos de pH e temperatura seguindo orientações do item 4.3.3. Nestes ensaios obteve-se como resultado o valor de pH ótimo em pH 7,5 (Figura 5.12) diferente do obtido nos experimentos anteriores aos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia (6,5). Já os dados de temperatura confirmaram o valor de 40°C como a ótima para o processo hidrolítico utilizando-se lipase comercial de *C. rugosa*. (Figura 5.13).

Figura 5.12: Valores de atividade enzimática de solução preparado enzimático de *C. rugosa* atuando sobre manteiga na faixa de pH estudada nos ensaios após biodegradação anaeróbia.

Figura 5.13: Valores de atividade enzimática de solução preparado enzimático de *C. rugosa* atuando sobre manteiga na faixa de temperatura estudada nos ensaios após biodegradação anaeróbia.

Determinadas as condições ótimas de pH e temperatura, verificou-se a produção de ácidos graxos voláteis livres ao longo do tempo. A Figura 5.14 mostra os resultados obtidos ao longo do tempo.

Figura 5.14: Micromoles de ácidos formados ao longo do tempo com pH 7,5 e temperatura de 40°C durante os ensaios realizados após os estudos de biodegradabilidade anaeróbia.

Após ensaios, observou-se que o tempo de hidrólise passou de 16 horas obtidas nos ensaios antes da biodegradação anaeróbia para 18 horas. Diante do exposto, adotou-se o valor de 18 horas para os ensaios de concentração de gorduras de manteiga.

A Figura 5.15 mostra as massas de ácidos graxos obtidas quando variaram-se as quantidades fornecidas de gordura em frascos reatores com mesma atividade enzimática. As produções líquidas a partir das diferentes concentrações de gorduras fornecidas foram diferentes e crescentes, todavia quando se calculou o fator de conversão de substrato (concentração de gordura) em produto (ácido oleico) ($Y_{ph/s}$, Equação 5.4), percebeu-se que a menor relação utilizada (6g de gordura / g de enzima) apresentou maior valor (Tabela 5.3). Esta concentração foi a metade da concentração utilizada nos primeiros ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

$$Y_{ph/s} = \frac{\mu\text{mol de ácido oleico}}{\text{massa de gordura}} \quad (\text{Equação 5.4})$$

Tabela 5.3: Relação entre produto e substrato das concentrações de gordura estudadas.

Relação entre a massa de gordura (g)/g de enzima	Atividade Enzimática(U) / Massa de Gordura (g)	$\mu\text{mol de ácido oleico}$	$Y_{ph/s}$
6	3	5,619050324	0,9365084
12	1,5	8,068797917	0,6723998
18	1,0	6,08943912	0,3383022
24	0,75	6,424765787	0,2676986
30	0,6	7,116377037	0,2372126
36	0,5	7,884833981	0,2190232
42	0,43	18,56172819	0,4419459
48	0,38	18,20311495	0,3792316
54	0,33	15,84651366	0,293454
60	0,3	12,98226505	0,2163711
66	0,27	14,30959977	0,2168121

Figura 5.15: Resultado da análise dos efeitos da relação de g de gordura por g de enzima da lipase comercial de *C. rugosa*.

Quando utilizou-se concentração 42g de manteiga por grama de enzima, obteve-se a maior concentração de ácidos de cadeia longa, medidos como ácido oleico, produzida (Tabela 5.3). Apesar disso, é importante salientar que o fator de conversão calculado foi menor do que os obtidos quando se utilizaram as duas menores concentrações de gordura.

Estudos realizados por Jeganathan *et al.* (2006), com enzima de *C. rugosa* livre e Jeganathan *et al.* (2007)a e Jeganathan *et al.* (2007)b, com a mesma enzima, todavia imobilizada, apresentaram relação de 25g de gordura por grama de enzima em seus ensaios. Independentemente dessa relação, Jeganathan *et al.* (2006) verificou que o desempenho do sistema caiu acentuadamente em taxas de carga mais elevadas, e a presença alta de gorduras, óleos e ácidos graxos causou um grave flotação do lodo. Segundo os autores, o substrato, mesmo hidrolizado, acumulado sobre a biomassa levou à flotação e eliminação de biomassa, colapsando o sistema.

Leal *et al.* 2006 trabalharam com dois reatores UASB, um com efluente sob tratamento enzimático (*Penicillium restrictum*) e outro com efluente não hidrolisado. O estudo promoveu uma variação na concentração em 200, 600 e 1000 mg/L com relação massa de gordura / massa de enzima variando de 0,2 a 1 g/g. O desempenho de ambos reatores foi similar para os ensaios de concentração 600 g/L de gordura. Entretanto, os benefícios tratamento foram observados na maior concentração (1g / L). Houve uma redução da DQO em 90% no tratamento hidrolisado e 82% no tratamento controle.

No presente estudo, a faixa de relação massa de gordura / massa de enzima utilizada foi de (6 g/g a 66 g/g) muito acima da trabalhada pelos autores acima citados. Sabendo que o ensaio de biodegradabilidade anaeróbia utilizando enzima de *Candida rugosa* realizado no presente trabalho foi com uma concentração 12g/g obtendo, com esses valores, uma produção metanogênica específica 4,3 maior que a observada quando fornecido gordura *in natura*, pode-se deduzir que a relação gordura/enzima utilizada, acima dos observados em outros trabalhos, pode apresentar bons resultados em relação à produção de metano, o que representa economia de recursos referentes à aquisição e utilização de enzimas.

Leal *et al.* 2002 também usando extrato de *Penicillium restrictum* testou diferentes condições de hidrólise variando as concentrações de lipídeos de 180 a 1200 mg /L sendo utilizada a seguinte faixa de atividade enzimática por grama de gordura: 194,4 U/g – 1295 U/g. Em seus ensaios de maior concentração lipídica, 1,2 g/L, verificou-se que a eficiência de remoção de DQO foi de 19% no efluente sem tratamento enzimático e 80% no efluente hidrolisado. No ensaio de

biodegradabilidade anaeróbia realizado no presente trabalho, utilizou-se 5mL de suspensão de gordura (hidrolisada ou in natura) com concentração 48,8 g/L. Isso representou 0,24 g de gordura sob atividade enzimática total no frasco de 18U. A relação entre a atividade enzimática e a massa de gordura foi de 75U/g, inferior à utilizada por Leal et al. (2002). Há que salientar, todavia que os objetivos dos trabalhos foram diferentes, mas, os resultados ora obtidos indicam que, para a produção de metano com elevados tempos de detenção, é possível utilizar menores relações entre atividade enzimática e massa de gordura dos que as necessárias no tratamento de efluentes gordurosos em reatores de alta taxa.

6. CONCLUSÕES

✓ As condições ótimas de ação de lipase comercial de *C. rugosa* em gorduras do leite testadas para os ensaios da biodegradabilidade anaeróbia foram obtidas com temperatura de 40°C e pH de 6,5. As condições ótimas de ação de preparado enzimático líquido de *G. candidum* em gorduras do leite foram obtidas com temperatura de 40°C e pH de 7,5.

✓ Os tempos de processo hidrolítico para a produção máxima de ácidos foram de 8 horas e 16 horas quando se utilizaram preparado enzimático líquido de *G. Candidum* e solução de lipase comercial de *C. rugosa*.

✓ O maior valor de velocidade inicial de produção de biogás, 1,47 mL.h⁻¹, ocorreu no ensaio com manteiga hidrolisada com enzima comercial de *C. rugosa*, seguido do valor obtido no ensaio com manteiga hidrolisada com preparado enzimático líquido de *G. candidum* (0,92 mL.h⁻¹), seguido finalmente pelo valor obtido no ensaio com gordura *in natura* (0,54 mL.h⁻¹).

✓ As velocidades de processo, bem como os valores de biodegradabilidade anaeróbia, produção metanogênica específica e coeficiente de conversão (Yp/s), indicaram ser mais vantajosa a utilização de lipase de *C. rugosa* na hidrólise das gorduras quando o objetivo do processo é a produção de biogás a partir da degradação de gorduras do leite. A utilização de preparado enzimático de *G. candidum* não ofereceu benefícios quando se compararam os processos de produção de metano com gordura hidrolisada e não hidrolisada.

✓ A biomassa exposta aos ácidos graxos de cadeia longa advindos da hidrólise das gorduras da manteiga apresentou diminuição da atividade metanogênica específica. Verificou-se que houve diminuição de 66% da AME nos frascos nos quais se hidrolisou a gordura com enzima de *C. rugosa* e de 71% da AME nos frascos hidrolisou-se a gordura com preparado enzimático de *G. candidum*.

✓ Quando se variou a concentração de substrato no processo hidrolítico, obteve-se maior fator de conversão quando se utilizaram 6 gramas de gordura por grama enzima; todavia obteve-se maior concentração de produto quando esta relação foi de 42 gramas de gordura por grama de enzima baseado na produção de ácido oleico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Eng. Sanit. Ambient.** v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ALVES, M. M.; PEREIRA, M. A.; SOUZA, D. Z.; CAVALEIRO, A. J.; PICAVET, M. SMIDT, H.; STAMS, A. J. M. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). Minireview. **Microbial Biotechnology**. v. 2, n. 1, p. 538-550, 2009.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Review in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 3 p. 117-129, 2004.

BELANÇON, D., FUZATTO, M. C.; GOMES, D. R. S.; CICHELO, G. C. V.; PINHO, S. C.; RIBEIRO, R.; TOMMASO, G. A comparison of two bench-scale anaerobic systems used for the treatment of dairy effluents. **International Journal of Dairy Technology**. , v. 63, p. 1 - 8, 2010.

CAVALEIRO, A. J.; SALVADOR, A. F.; ALVES, J. I.; ALVES, M. M. Continuous High Rate Anaerobic Treatment of Oleic Acid Based Wastewater is Possible after a Step Feeding Start-Up, **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, p. 2931–2936, 2009.

CAVALEIRO, A.J.; FERREIRA, T.; TOMMASO, G.; ALVES, M.M. Anaerobic biodegradability of meat-processing wastes: effect of physical, chemical and enzymatic pre-treatments. *In* **International IWA-Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste and Energy Crops**. Vienna, 2011

CAVALEIRO, A.J.; FERREIRA, T.; TOMMASO, G.; ALVES, M.M. Biochemical methane potential of raw and pre-treated meat-processing wastes. **Bioresource Technology**. v. 129, p. 519–525, 2013.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 4044-4064, 2008.

CHERNICHARO, C.A.L. Reatores Anaeróbios. DESA/UFGM, v. 5, 1997.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. “Tratamiento anaeróbico de aguas residuales”. In: **III Taller y Seminario Latinoamericano**. Montevideo, Uruguay, p. 97-110, 1994.

GOMES, D.R.S.; PAPA, L.G.; CICHELO, G.C.V.; BELANÇON, D.; POZZI, E.G., BALIEIRO, J.C.C.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TOMMASO, G. Effect of enzymatic pretreatment and increasing the organic loading rate of lipid-rich wastewater treated in a hybrid UASB reactor. **Desalination**. v. 279, p. 96–103, 2011.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied Environmental Microbiology** v. 66, p. 5488–5491, 2000.

HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G.; Tratamento anaeróbico de esgotos – **Um manual para regiões de clima quente**. Brasil: EPGRAF , 1994. 199 p.

HEUER H.; KRSEK M.; BAKER P.; SMALLA K.; WELLINGTON E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied. Environmental. Microbiology**. v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HWU, C. K.; TSENG, S. K.; YUAN, C. Y; KULIK, Z.; LETTIGA, G. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. **Wat. Res.**. v. 32. n. 5, p. 1571-1579, 1998.

HWU, C.S.; LETTIGA, G. Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic anaerobic sludges. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21, p. 297-301, 1997.

HWU, C. S.; DOLON, B.; LETTIGA, G. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic kludges from various origins. **Water Sci. Technol**. v. 34, n. 5-6, p. 351-358, 1996.

J E G A N A T H A N, J; N A K H L A, G.; B A S S I, A. Long-term performance of high-rate anaerobic reactors for the treatment of oily wastewater. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 6466 - 6472, 2006.

J E G A N A T H A N, J; N A K H L A, G.; B A S S I, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. **Journal of Hazardous Materials.** v. 145, p. 127 – 135, 2007(a).

J E G A N A T H A N, J; N A K H L A, G.; B A S S I, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR–UASB system. **Chemosphere** v. 67, p. 1492–1501, 2007(b).

KAPID, S. S.; VIJAY, V. K., RAJESH, S. K.; PRASAD, R. Biogás scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. **Renewable Energy.** v. 30, p. 1195-1202, 2004.

KARAN, J.; NICELL, J. A. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 69, 1997.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 202p., 2001.

KOSTER, L.W.; CRAMER, A. **Appl. Environ, Microbiol.** v. 53, 1987.

KUDO Y.; NAKAJIMA T.; MIYAKI T.; OYAIZU H. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS. Microbiology Ecology.** v. 22, p. 39–48, 1997.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.G.M.; SANT’ANNA JR, G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brasilian Journal of Chemical Engineering.** v. 19, p. 175-180, n. 02, 2002.

LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G; CAMMAROTA, M.C.; SANT’ANNA JR, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry.** v. 41, p. 1173–1178, 2006.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 90-95, 1997.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 145-155, 2001.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32, p. 185-190. 2006.

MENDES, A. A.; H. F. CASTRO; PEREIRA, F. B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**. v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MORAES, E.M., ADORNO, M.A.T., ZAIAT, M., AND FORESTI, E. (2000). Determination of volatile fatty acids by gas chromatography in effluents from anaerobic reactors treating solid and liquid wastes. In: Proceedings of Workshop and Symposium on Anaerobic Processes. Recife, 2 p. 231 – 234.

MUYZER, G., WAAL, E.C., UITTERLINDEN, G., (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNAr. *Applied Environmental Microbiology* 59, 695–700.

NEVES, L.; PEREIRA, M. A.; MOTA, M.; ALVES, M. M.; Detection and quantification of long chain fatty acids in liquid and solid samples and its relevance to understand anaerobic digestion of lipids. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 91 – 96, 2009.

OMIL, F.; GARRIDO, J. M.; ARROJO, B.; MÉNDEZ, R. **Water Res.**, v. 37, 2003.

PEREIRA, M.A.; PIRES, O.C.; MOTA, M.; ALVES, M.M. Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitic acid as a key intermediate. **Water Science and Technology**. v. 45, n. 10, p. 139-144, 2002.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FUGIRO JR., A. *In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações*. Florianópolis, Brasil, 2003.

PEREIRA, M.A.; PIRES; MOTA, M.; ALVES, M.M. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: Evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulations onto the anaerobic sludge. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 92, n. 1, 2005.

SIGUEMOTO, E. S.; FUZATTO, M. C.; DIBIAZI, A. L. B.; SANTANA, R. S. S.; RIBEIRO, R.; KAMIMURA, E. S.; TOMMASO, G. Influência da pré-hidrólise enzimática no desempenho de um ASBBR tratando efluentes de laticínios, *In: Anais eletrônicos do 17º Siicusp*, Pirassununga, 2009.

SILVA, G.S. **Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, 2012.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**. Vanderbilt University Nashville, Tennessee: Arquea Press, 1996, 394 p.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 202p., 2001.