



CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



DESIGN EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO *ASPERGILLUS* SP.

T. M. SOUZA¹, J. S. FONSECA² e R.L. SERUDO^{1,2}

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Departamento de Engenharia Química

² Hub – Tecnologia e Inovação, Laboratório Ilum

E-mail para contato: tmds.eng16@uea.edu.br

RESUMO – As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e síntese de triacilgliceróis, gerando matéria-prima para a obtenção de produtos e processos de alto valor comercial. Estas são geradoras de matéria-prima para a obtenção de produtos e processos de alto valor comercial. Dessa forma, o fungo *Aspergillus* sp., considerado ótimo produtor da enzima, foi submetido à fermentação submersa para produção de lipase. Para este estudo foi elaborado um delineamento composto central 2³ para análise das variáveis, como: pH, concentração de substrato (%) e tempo (dias), que podem influenciar o processo. Portanto, a maior atividade específica foi 117.29 U/mg nas condições de 25°C, pH 11, concentração de substrato 15%, agitação de 150 rpm e tempo de 7.32 dias. O fator mais significativo foi o tempo, em seguida a interação entre pH e óleo e a interação entre pH e tempo. Além disso, o modelo explicou 60% dos fenômenos, onde uma equação matemática foi obtida para descrever a produção enzimática com as variáveis estudadas.

1. INTRODUÇÃO

As tecnologias enzimáticas tornaram-se um campo promissor para obtenção de composto de alto valor agregado devido ao uso de tecnologias mais limpas e uso de matérias-primas renováveis. Assim, as lipases passaram a ter um enfoque maior pelo fato de serem solúveis em água, entretanto, catalisam reações que têm substratos lipofílicos (Dos Santos, 2012; Fernandes, 2007; Monteiro e Silva, 2009).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Por terem uma afinidade com diversos substratos, estabilidade em diferentes faixas de temperatura, pH e solventes orgânicos, possuem aplicação biotecnológica em uma ampla gama de setores, como: indústria farmacêutica, cosméticos, tratamento de efluentes e alimentícia (Carvalho *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2004; Gupta, 2006).

O custo para uso destas enzimas na indústria é exorbitante, onde os preços de venda chegam a R\$2000,00, em média, uma grama. Isso deve-se às condições específicas de produção para cada processo. Para minimizar os gastos, é necessário investir em tecnologias, como: equipamentos e processos otimizados, utilizando ferramentas estatísticas (Matias *et al.*, 2005; Messias *et al.*, 2011).



O presente estudo tem como objetivo analisar a produção de lipase extracelular utilizando o fungo *Aspergillus* sp. e como substrato o óleo doméstico residual, e assim, tornando-se uma alternativa para redução dos custos produtivos. Através do delineamento composto central 2^3 utilizando o software Statística v.12, buscou-se avaliar as variáveis que podem influenciar a produção como: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH e concentração de substrato (%).

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Microorganismo e preparo do inóculo

O fungo *Aspergillus* sp. utilizado neste estudo foi adquirido na micoteca do Laboratório ILUM do Hub - Tecnologia e Inovação na Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, onde foi desenvolvido o projeto. Para efeito de cultivo e reativação, foi inoculado 50 μL da água com esporos do fungo em meio de batata (BDA) (200g de batata, 20g de dextrose, 15g de ágar em 1L de água destilada) e incubado à 30 $^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após reativação, o fungo foi inoculado em tubo falcon contendo meio de batata (BDA) à 30 $^{\circ}\text{C}$ por 3 dias para posterior coleta dos esporos. Foi adicionado 1mL de água destilada autoclavada no tubo e raspou-se suavemente para favorecer a suspensão de esporos, e então, foi transferida para erlenmeyer de 125 mL contendo porcentagem de substrato em relação ao volume (50 mL) de acordo com delineamento composto central 2^3 gerado no software Statística v. 12 e o restante meio mínimo de Manachini (2g de KH_2PO_4 , 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9g de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1g de Extrato de levedura em 1L de tampão) com pH também obtido no delineamento.

2.2 Fonte de carbono

Como indutor de fonte de carbono para a produção de lipase, foi utilizado óleo de fritura residual de soja em residências de parceiros do projeto usuários da marca de óleo Soya. O tempo de fritura estimado é de 15 minutos e foi utilizado para fritar banana a 100 $^{\circ}\text{C}$.

2.3 Design experimental para produção de lipase

Usando o Composto Central 2^3 gerado no software Statística, observou-se a influência do tempo (8 - 10 dias), pH (9 - 11), e concentração da fonte de carbono (10 - 20%) no volume total do meio em diferentes níveis (-1.682, -1, 0, +1, +1.682), com temperatura fixa de 25 $^{\circ}\text{C}$ e agitação 150 rpm, obtendo como resposta a atividade específica de lipase (U/mg).

2.4 Determinação quantitativa de atividade lipolítica

A dosagem foi realizada para análise da amostra de acordo com a metodologia descrita por (HENRY, 1957; ROE, 1963; WILLIAMSON, 1975) utilizando kit colorimétrico para lipase da marca *In Vitro*. Foi colocado em microplaca 50 μL de solução tampão Tris 0.1 mol/L, 2.5 μL de amostra, 2 μL de inibidor (fenil-metil-sulfonil fluoreto 20 mmol/L em etanol), e 5 μL de reagente de cor. Depois disso, a amostra foi aquecida no monobloco por 2 minutos a 37 $^{\circ}$. Em seguida, foi adicionado 5 μL de substrato (BALB 20 mmol/L) e aquecidos no monobloco por



30 minutos a 37°C. Após esse período, foi adicionado 100µL de inativador (Lauril sulfato de sódio 27.6 mmol/L) nas análises da amostra. O branco foi composto por 64.5µL, incubado por 30 minutos a 37°C, e 100µL de inativador. A leitura foi feita a 410 nm no Espectrofotômetro da marca Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., LTD. modelo MR-96A.

2.5 Dosagem de proteínas (Bradford, 1976 adaptado)

A dosagem foi feita usando 18.3µL de água destilada, 15µL do extrato enzimático e 266.6µL do reagente de Bradford por cinco minutos a temperatura ambiente. A leitura no espectrofotômetro marca Shimadzu UV-1800 foi realizada com comprimento de onda de 595nm. O branco foi feito usando 33.3µL de água destilada e 266.6µL do reagente de Bradford.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados no Statistica versão 12.0 para a geração de gráficos de superfície e modelo matemático, além da análise variância (ANOVA) com $p = 0.05$. Além disto, também foi realizado o Teste F para averiguar a qualidade do modelo gerado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de resultados obtidos em um planejamento experimental anterior, propôs-se um novo delineamento composto central para avaliar os efeitos do pH, tempo (dias) e concentração de óleo (%), que foram as variáveis significativas no planejamento anterior. Assim, a matriz do delineamento e resultados obtidos de atividade específica U/mg seguem abaixo na tabela 1.

Tabela 1 – Atividade específica nos parâmetros do composto central 2³

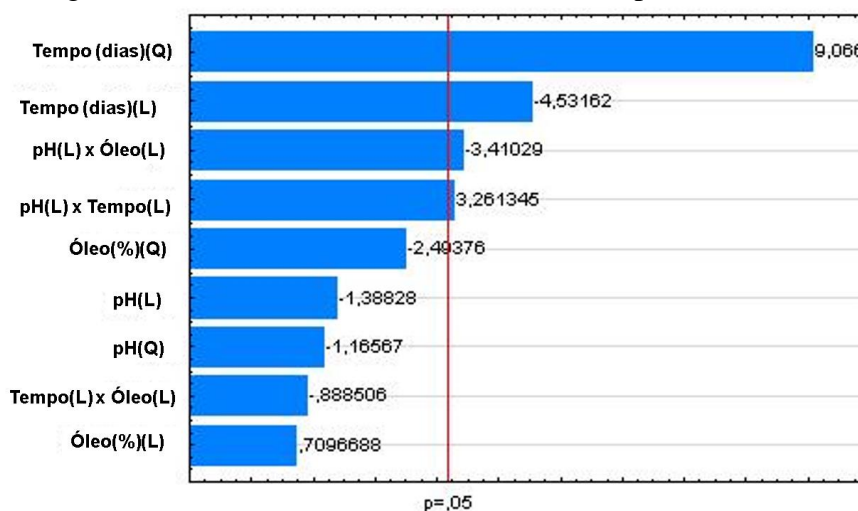
Teste	pH	Tempo (dias)	Óleo (%)	Atividade lipolítica (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	10	8	10	157.715	15.071	10.46
2	10	8	20	361.876	10.926	33.12
3	10	10	10	137.885	36.026	3.83
4	10	10	20	421.364	16.111	26.15
5	12	8	10	262.588	26.553	9.89
6	12	8	20	157.017	16.900	9.29
7	12	10	10	686.969	16.900	40.65
8	12	10	20	567.154	23.413	24.22
9	9.32	9	15	304.063	8.360	36.37
10	12.68	9	15	154.084	14.640	10.52
11	11	7.32	15	524.003	4.467	117.29
12	11	10.68	15	319.144	9.329	34.21
13	11	9	6.59	343.024	17.187	19.96
14	11	9	23.41	315.374	23.611	13.36
15 (C)	11	9	15	269.151	17.116	15.73
16 (C)	11	9	15	489.232	18.623	26.27
17 (C)	11	9	15	319.563	21.852	14.62
18 (C)	11	9	15	243.736	21.278	11.45

O teste 11 apresentou a maior atividade específica de 117.29 U/mg. Este valor se mostra superior comparado com Lima *et al.* (2004) que em meio contendo fonte de nitrogênio de baixo custo obteve 111 U/mg, com Fernandes (2007) que obteve 59 U/mg do extrato bruto utilizando *Burkholderia cepacia* cultivada em fermentação sólida e a lipase bruta de *Geotrichum candidum* comercializada pela Amano Pharmaceutical Co (GC-4), Japão, que apresenta atividade específica de 80 U/mg, conforme Carvalho *et al.* (2005).

Ademais, o teste 3 apresentou a menor atividade específica de 3.83 U/mg, mas se mostra superior em comparação com Razak (1996) que obteve 1.2 e 1.14 U/mg utilizando *Rhizopus oryzae*, com Colen *et al.* (2006) que obteve 2.7 U/mg ao fermentar *C.gloesporiodes* por 96h e com Carvalho *et al.* (2005) que obteve 0.56 U/mg.

A partir do gráfico de Pareto (Figura 1) verificou-se que o tempo, tanto em relação ao efeito linear quanto quadrático, foi a variável de maior significância para a atividade lipásica ao nível de confiança (95%) em relação ao grau de liberdade. O tempo (L) tem um efeito negativo, indicando que com a diminuição do tempo, a produção enzimática aumenta. Entretanto, como o tempo (Q) tem efeito positivo, existe um certo nível limitante para melhoramento da resposta. Ademais, a interação entre pH(L) e óleo(L) e a interação entre pH(L) e tempo(L) se mostraram significativas para o processo.

Figura 1 - Gráfico de Pareto dos testes do composto central 2³.



Foi possível explicar cerca de 60% dos fenômenos que ocorre durante a produção lipásica com a possibilidade de alcançar 98.76%, se corrigidos os ajustes de acordo com a ANOVA. Para validar o modelo, empregou-se o teste F, que é usado para medir a precisão. Os valores obtidos do Teste F em relação à regressão e à falta de ajuste estão representados nas equações 1 e 2 abaixo.

$$\frac{\text{Média quadrática da regressão}}{\text{Média quadrática resíduo}} = 19.69 > 4.49 = F_{1,16} \quad (1)$$



CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



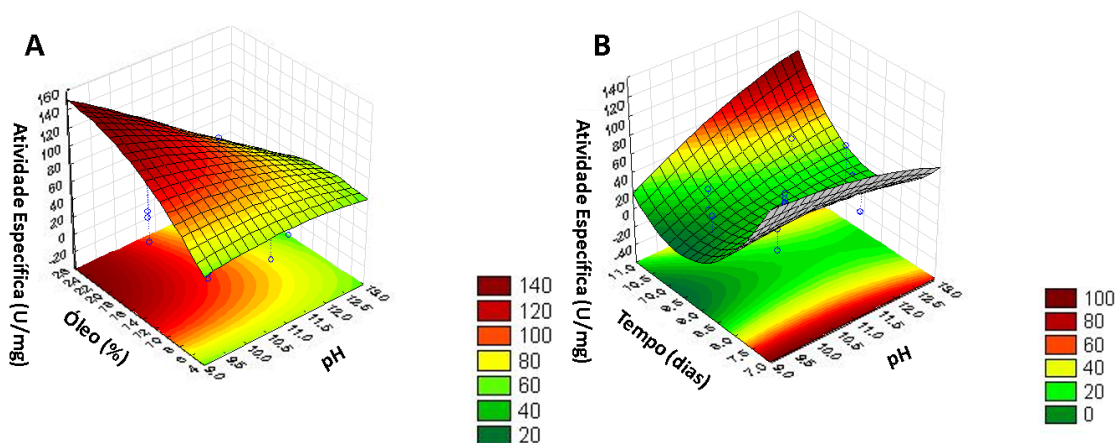
$$\frac{\text{Média quadrática devido a falta de ajuste}}{\text{Média quadrática erro experimental}} = 536.54 > 4.54 = F_{1,15} \quad (2)$$

Pelo fato de a regressão ser significativa (equação 1), há uma relação entre as variáveis estudadas para compor o modelo quadrático e as variáveis externas pouco alteram o sistema. Através do ajuste e erros (equação 2) foi possível mostrar a possibilidade de melhorar o modelo de estudo. Assim, obteve-se um modelo matemático que descreve o comportamento da atividade específica em função do pH, tempo e concentração do substrato, conforme equação 3.

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = 17.99 - 2.41pH - 7.88\text{tempo} + 1.23\text{substrato} - 2.1pH^2 + 16.38\text{tempo}^2 - 4.5\text{óleo}^2 + 7.41pH\text{tempo} - 7.75pH\text{óleo} - 2.02\text{tempo}\text{óleo} \quad (3)$$

Por meio das superfícies de resposta (Figura 2), verificou-se uma tendência de maior atividade lipásica quando empregada as condições de maior concentração do substrato e menor pH, assim como, maior tempo e maior pH ou menor tempo e menor pH.

Figura 2 - Superfície de resposta de atividade enzimática de lipase em diferentes faixas de pH e concentração de substrato (%) produzida por *Aspergillus* sp. em 150 rpm e 25°C em A) 7 dias e em B) 10% de óleo (substrato).



De acordo com figura 2a, quando o pH diminui, a concentração de substrato que pode ser aplicada no processo fermentativo aumenta. Em 7 dias, pH 9 e 24-26% de óleo, pode-se obter 140 U/mg de atividade específica. Na figura 2b, ao reduzir o tempo (dias) e o pH, ou ao aumentar o tempo (dias) e o pH, a atividade específica aumenta devido a interação significativa entre essas duas variáveis, de acordo com a figura 1. Assim, em 7 dias (ou 11 dias), pH 9 (ou pH 12) e 10% de substrato, a atividade específica é de 100 U/mg.

Portanto, para otimizar a atividade lipásica, as melhores faixas de pH devem estar entre 9-12 e a concentração do substrato entre 10-26%. Além disso, deve-se continuar utilizando temperaturas em torno de 25°C para não ocorrer desnaturação enzimática (Murray et al., 2003) e agitação próxima de 150 rpm para melhor biodisponibilidade dos nutrientes, conforme Cihangir e Sarikaya (2004).



CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos determinaram que o tempo (L) de fermentação e a interação entre pH(L) e óleo(L) tem efeito negativo resultando na máxima produção de lipase pelo fungo *Aspergillus* sp. em fermentação submersa. Ademais, quando a interação entre pH(L) e tempo(L) aumenta, a atividade também aumenta. Assim, a condição ideal deve ser obtida ao utilizar o pH próximo de 9 ou 12, tempo em torno de 7 ou 11 dias, concentração de substrato entre 10-26% e permanecendo com 25°C e 150 rpm. Além disso, pôde-se obter uma visão geral da estimativa de efeitos e ANOVA, sendo explicado 60% dos fenômenos e havendo a necessidade de melhorar o modelo de estudo.

5. REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 193-97, 2004.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A.A.; SANTOS, C. J. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- COLEN, Gecernir; JUNQUEIRA, Roberto Gonçalves; MORAES-SANTOS, Tasso. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.
- DOS SANTOS, R. R. Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido. *Embrapa Agroenergia-Outras publicações científicas (ALICE)*, 2012.
- FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal do Paraná, 2007.
- LIMA, Valéria MG et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 31, n. 1-3, p. 53-61, 2004.
- MATIAS, E., PIMENTEL, N. Biotecnologia: Um desafio para o Amazonas. *Parcerias Estratégicas*, v. 21, n.1, 2005.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, v. 32, n. 2, p. 213- 234, 2011.
- MONTEIRO V. N., SILVA R. N. Aplicações Industriais da Tecnologia Enzimática. *Processos Químicos*. Goiânia: SENAI/DR, v.3, n.5, ano 3, p.10-23, jan/jun 2009.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. M. *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, p. 2113, 2003.
- RAZAK, C. N. A. et al. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, n. 1-4, p. 153-159, 1997.