

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO *ALTERNARIA* SP. OBTIDO A PARTIR DE CAULES DE *MANIHOT ESCULENTA*, CRANTZ

Leandro Luís Cesar de Oliveira junior¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI

Leandrocesar.0620@gmail.com; preamorandim@fei.edu.br

Resumo: Fungos têm mostrado eficiência produção de enzimas para serem aplicadas na obtenção de diversos produtos como, por exemplo, os biocombustíveis. Dessa forma, visando contribuir com os trabalhos que vêm sendo desenvolvidos na busca de novas fontes enzimáticas, durante o desenvolvimento deste trabalho foi feita a otimização das condições de cultura do fungo *Alternaria* sp em termos de temperatura e tempo para produção de lipase sendo verificado que a condição ideal foi um crescimento por 8 dias a 19°C.

1. Introdução

A capacidade de microrganismos produzirem enzimas se mostra de grande importância para o crescente mercado de biocombustíveis, devido a características como estereoespecificidade elevada, redução da formação de produtos paralelos, operação em condições menos rigorosas de processo entre outras [1]. Porém, a competitividade de mercado das enzimas não é atraente devido ao preço associado [1], logo estudos relacionados a produção em condições ideais e consequente preço vantajoso apresentam cada vez mais relevância [2]. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi a verificação da produção de lipase pelo fungo *Alternaria* sp. e posterior otimização das condições de produção da mesma pelo fungo.

2. Metodologia

Inicialmente, o fungo CA5 (*Alternaria* sp.) foi submetido a três repiques consecutivos em meio batata dextrose agar (BDA). Cada crescimento foi realizado por 7 dias a 24°C em Câmara climatizada. Após essa etapa, o fungo foi submetido ao crescimento em meio líquido [ácido cítrico (10 g/L); sulfato de magnésio (14 g/L); sulfato de cálcio (0,93 g/L); sulfato de potássio (18,2 g/L); hidróxido de potássio (4,13 g/L); sulfato de amônio (5 g/L); ácido fosfórico (4,25 mL/L); difosfato de amônio dibásico (12,4 g/L); cloreto de cálcio (0,02 g/L); cloreto de potássio (0,7 g/L), extrato de malte (0,8 % - m/v), peptona (1 % - m/v) e, azeite de oliva (40 g/L)] variando-se o tempo de cultivo e a temperatura. Todos os processos foram realizados em um Shaker utilizando-se uma rotação de 160 rpm e os resultados avaliados utilizando-se o programa Statistica 14.0.0.15 para otimização da condição de fermentação e produção de lipase.

Durante a determinação da atividade enzimática 900 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7.0) foram misturados com 80 µL de *p*-nitrofenil palmitato 2,5mM em em acetonitrila/metanol (1:1). A essa mistura foram adicionados 20 µL de extrato enzimático e a reação foi processada a 30°C durante 10 min. Todos os dados foram

analisados via HPLC para verificação da concentração de *p*-nitrofenol formada. Também foi avaliada a concentração de proteínas em cada extrato pelo método de Bradford.

3. Resultados e Discussões

No presente trabalho, inicialmente o fungo CA5 foi submetido ao crescimento em meio BDA e, posteriormente, ao crescimento em meio líquido modificando-se a temperatura, o tempo (Figura 1) para otimização da produção de lipase.

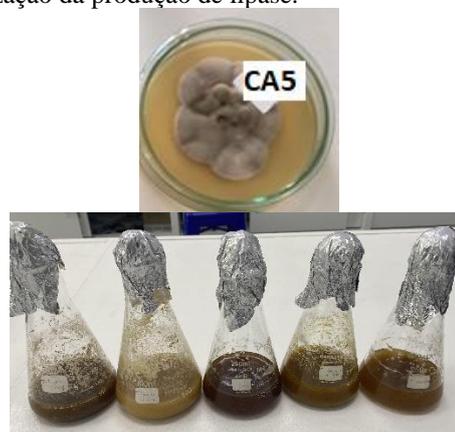


Figura 1 – Crescimento em meio BDA e meio líquido

Após a realização do crescimento em meio líquido em diferentes condições e avaliação da atividade enzimática referente a produção de lipase bem como a determinação da concentração de proteínas, foi realizada a determinação da atividade específica (Tabela I) sendo os dados utilizados para a otimização da condição de produção de lipase.

Tabela I – Atividade específica - produção de lipase

Temperatura	Tempo	Atividade específica (U/mg)
40	8	0.52
40	8	0.60
40	4	0.27
61.2	8	0.01
40	12	0.11
55	11	0.10
25	5	0.56
18.8	8	1.34
25	11	0.60
55	5	0.04

A análise dos dados através da avaliação da superfície de resposta (Figura 2) mostrou que os maiores valores de atividade residem em um tempo entre 11 e 5 dias, com uma temperatura ideal que está entre 15 e 25 °C sendo possível descrever o modelo (Equação 1), que representa a atividade enzimática (U/mg) em função do tempo (x_1) e da temperatura (x_2) no intervalo estipulado.

$$A = 0,1637 - 0,0371x_1 + 0,0002x_1^2 + 0,4116x_2 - 0,02634x_2^2 + 0,00014x_1x_2 \quad (\text{Eq. 1})$$

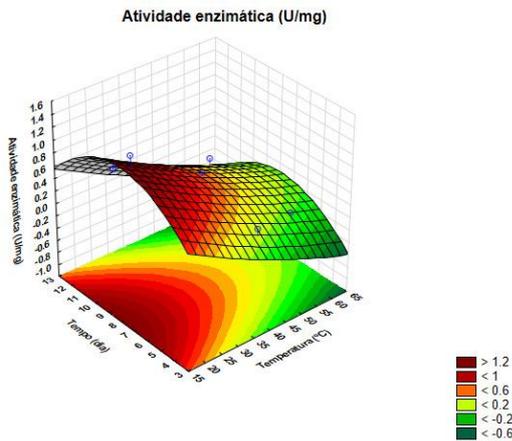


Figura 2 – Superfície de resposta obtida

Através da análise do diagrama de Pareto (Figura 3), verifica-se que a variável que exerce maior influência dentro do modelo é a temperatura, mais precisamente no termo linear da função. Esse fato se deve a sensibilidade, do fungo e da enzima secretada, para temperaturas que superam 40°C.

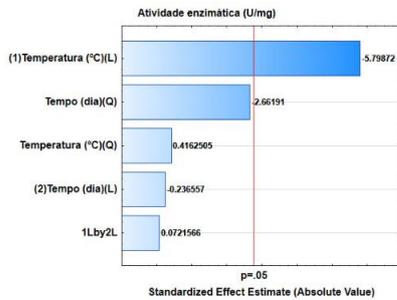


Figura 3 – Diagrama de Pareto

Posteriormente foi determinada a condição ideal para realização do processo de fermentação e produção de lipase (figura 4). Analisando-se os resultados, verifica-se que o crescimento ideal reside nas menores temperaturas, resultando em 19°C para a maior produtividade. Em termos de tempo de crescimento, foi estimado um tempo de 8 dias no ponto de máxima interação. Após a realização de um novo crescimento nesta condição, verificou-se uma atividade enzimática específica de 1,3356 U/mg e uma concentração proteica de 0,074 mg/mL.

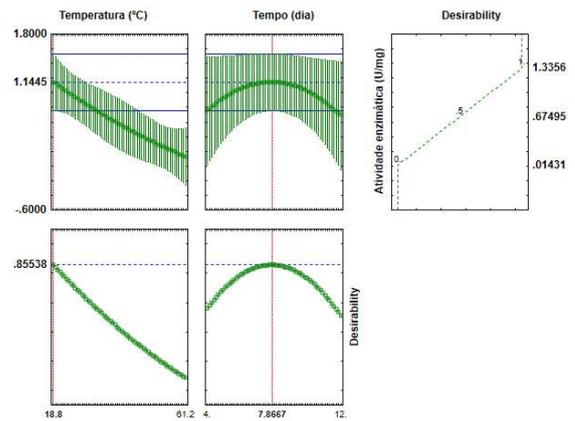


Figura 4 – Determinação do tempo e temperatura ideais de crescimento

4. Conclusões

Após o desenvolvimento do atual projeto foi possível definir o tempo de crescimento do fungo em 8 dias submetido a uma temperatura de 19°C. Neste tempo de crescimento foi observada uma atividade enzimática específica de 1,3356 (U/mg) e uma concentração proteica de 0,074 (mg/mL).

Ensaio futuros de purificação da enzima lipase e aplicação em processos como, por exemplo, de produção de biodiesel serão necessários para confirmar a viabilidade de utilização dessa fonte no mercado em larga escala.

5. Referências

- [1] ATHAR, M.; ZAIDI, S. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **8** (2020) 104523.
- [2] GEOFFRY, K.; ACHUR, R.N. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **16** (2020) 327-334.

Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pelo incentivo ao desenvolvimento do trabalho e suporte necessário.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 09/21 a 08/22.