



PLANEJAMENTO DOEHLERT PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FERMENTATIVAS NA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE POR *ASPERGILLUS NIGER*

Fabiane Neves SILVA^{1*}, Dhiéssica dos Santos RIBEIRO³, Gabriel Lucas Silva de JESUS⁴, Iana Trevizani EMMERICH⁵, Floriatan Santos COSTA⁶, Marcelo FRANCO²

¹Doutorado em engenharia e ciência de alimentos, UESB, Programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimentos; ²Docente/pesquisador, UESC, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas; ³Pós-graduação em biotecnologia, UFBA, Departamento de biotecnologia; ⁴Graduação em química, UESC, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas; ⁵Graduação em Ciências biológicas, UESC, Departamento de Ciências Biológicas; ⁶Pós-graduação em química, UFPR, Departamento de química
*E-mail para contato: fabinevezs@gmail.com

RESUMO – A endoglucanase faz parte de um grupo de enzimas com diversas aplicações, como biocombustíveis e alimentos, mas a sua obtenção é limitada devido ao custo elevado. A fermentação em estado sólido surge como alternativa de baixo custo e de fácil aplicabilidade. Nesse bioprocessamento é fundamental o estudo das melhores condições de fermentação (Temperatura, tempo e umidade) para obtenção da máxima produção enzimática. Desta forma, o presente estudo objetivou a aplicação de um Planejamento Doehlerht na otimização das condições de fermentação com palma forrageira e casca da amêndoa do cacau utilizando o fungo *Aspergillus Niger* ATCC 1004. A metodologia seguiu com a obtenção dos extratos enzimáticos a partir da fermentação e posterior quantificação da atividade da enzima baseada na medição dos açúcares redutores, as condições de fermentação foram dadas pela Matriz experimental Doehlerht. Foram observadas que 28°C e 60% se apresentaram como as melhores condições de temperatura e umidade, enquanto que o fator tempo, determinado por testes com intervalos de 24 a 144h, foi de 96h. Essas condições são fundamentais para a obtenção da enzima, uma vez que interferem no desenvolvimento do fungo. Outros fatores importantes, aliados a essas condições incluem a espécie de fungo estudada e a composição dos substratos aplicados.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido; celulasas; metodologia de superfície de resposta; Doehlerht Design; fungos filamentosos.

DOEHLERT DESIGN FOR OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS IN THE PRODUCTION OF ENDOGLUCANASE BY *ASPERGILLUS NIGER*

ABSTRACT – Endoglucanase is part of a group of enzymes with various applications, such as biofuels and food, but its obtaining is limited due to the high cost. Solid state fermentation emerges as a low-cost and easily applicable alternative low cost and easy applicability. In this bioprocess, it is essential to study the best fermentation conditions (temperature, time and humidity) to obtain maximum enzymatic production. Thus, the present study aimed to apply a Doehlerht Design in the optimization of fermentation conditions with forage palm and cocoa



almond peel using the fungus *Aspergillus Niger* ATCC 1004. The methodology followed with the obtaining of enzymatic extracts from fermentation and subsequent quantification of enzyme activity based on the measurement of reducing sugars, fermentation conditions were given by the Doehlert experimental matrix. It was observed that 28°C and 60% were the best conditions of temperature and humidity, while the time factor, determined by tests with intervals from 24 to 144h, was 96h. These conditions are fundamental to obtain the enzyme, since they interfere in the development of the fungus. Other important factors, combined with these conditions include the species of fungus studied and the composition of the substrates applied.

Keywords: Solid-state fermentation; cellulases; response surface methodology; Doehlerht Design; filamentous fungi.

1. INTRODUÇÃO

As celulasas são um complexo de enzimas celulolíticas muito aplicadas comercialmente devido a capacidade de conversão de celulose, principal componente das células vegetais, em glicose. (Nunes et al., 2020). Possuem vasto nicho de aplicações como biocombustíveis (Siqueira et al., 2020) e indústria alimentícia (Santana et al., 2021). Dentre as celulasas, destaca-se as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) que atuam na hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas internas das moléculas de celulose reduzindo seu grau de polimerização (Oliveira et al., 2019; Hoda et al., 2021).

A principal dificuldade para a aplicação dessas enzimas consiste nos custos elevados para a sua obtenção. Sendo assim, a cada dia pesquisas envolvendo meios de produção menos dispendiosos tem se intensificado. Uma alternativa sugerida é a fermentação em estado sólido (FES) com a aplicação de resíduos agroindustriais e substratos disponíveis que são fontes de carbono e de outros nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo e produção da enzima (Marques, 2019). FES é um bioprocesso capaz de simular as condições ideais de crescimento do microrganismo e não requer equipamentos complexos ou sistemas de controle sofisticados para serem executados, sendo facilmente reproduzível (Neves et al., 2020).

Na FES, os fatores como umidade, tempo e temperatura podem influenciar no crescimento do microrganismo, consequentemente, na produção enzimática. Assim, a otimização das condições de fermentação baseada na metodologia de superfície de resposta (RSM) permite estudar esses múltiplos fatores simultaneamente e suas interações, tendo como resposta a produção da enzima. Uma das principais vantagens dessa metodologia é a redução do tempo e do número de experimentos a serem realizados (Carvalho et al., 2022). O Planejamento Doehlert se destaca como matriz experimental por permitir que diferentes variáveis sejam analisadas em diferentes níveis na mesma matriz e utilizam-se de uma quantidade menor de fatores experimentais para ser executado, o que o torna mais eficiente quando comparados ao Design Composto Central (CCD) e Box-Behnken Design (BBD) (Cerqueira et al., 2021).

No presente trabalho, foi aplicado um Planejamento Doehlert (DD) para determinar as condições ideais de fermentação (temperatura e umidade) a fim de se obter uma máxima produção da endoglucanase. A influência do fator tempo foi estudada por meio da quantificação da atividade enzimática nos intervalos de 24h a 144h. Para isso, foram utilizados como substrato para o crescimento fúngico a casca da amêndoa do cacau e palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*). A espécie de fungo filamentoso empregado para o bioprocesso foi o *Aspergillus Niger* ATCC 1004.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

A cepa de *Aspergillus Niger* ATCC 1004 utilizada neste estudo foi adquirida do INCQS/Fiocruz (município de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e pode ser consultado sob o código 40018.

A cepa foi mantida a 4 °C em meio ágar-dextrose-batata (PDA). A suspensão de esporos foi preparada utilizando o microrganismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 26 °C. Após a incubação, a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (0,01%, v/v) e a contagem do número de esporos foi realizada com o auxílio de um microscópio binocular e uma câmara de Neubauer.

2.2 Biomassa lignocelulósicas

O resíduo do cacau (*Theobroma cacao*) foi cedido pela empresa Barry Callebaut (Itabuna, Bahia, Brasil). A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) foi doada pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (Itapetinga, Bahia, Brasil).

Os materiais foram secos em estufa de secagem com circulação de ar (24 h, 65 °C), seguido de moagem em um moinho Wiley para um tamanho de grão de aproximadamente 2 mm. A umidade da biomassa foi determinada em um equipamento de infravermelho (ID200, MARTE, São Paulo, Brasil).

2.3 Fermentação em estado sólido

O processo de fermentação foi realizado em erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g das misturas de biomassas (80% cacau e 20% palma) obtidas anteriormente por delineamento experimental Projeto Simplex-Centroide. A inoculação foi realizada com 10^8 de esporos/grama de biomassa e a umidade desejada com adição de água destilada autoclavada. As culturas foram conduzidas em uma incubadora BOD (TE-371, Tecnal, Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada.

2.4 Efeito do tempo na atividade enzimática

O tempo ótimo para a máxima atividade da endoglucanase foi determinado através de testes com intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Para cada intervalo fez-se a quantificação da atividade da enzima conforme item 2.6.

2.5 Otimização multivariada

A otimização das condições do processo de fermentação, temperatura (°C) e umidade (%) foram avaliadas utilizando-se o DD. A matriz experimental foi composta por 6 corridas experimentais (Tabela 1), incluindo a repetições dos níveis de ponto central. Atividade de endoglucanase (U/mL) foi a resposta experimental usada para obter os modelos matemáticos.

Tabela 1. Matriz experimental Doehlert usada para otimizar as condições experimentais aplicadas à fermentação em estado sólido para produção de endoglucanase usando *Aspergillus Niger* ATCC 1004.

Experimento	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Endoglucanase (U/mL)
1	36 (1)	70 (0)	0,315
2	32 (0,5)	80 (0,866)	0,342

3	20 (-1)	70 (0)	0,266
4	24 (-0,5)	60 (-0,866)	0,420
5	32 (0,5)	60 (-0,866)	0,399
6	24 (-0,5)	80 (0,866)	0,302
7 ^a	28 (0)	70 (0)	0,401
8 ^a	28 (0)	70 (0)	0,405
9 ^a	28 (0)	70 (0)	0,376

a Ponto central

2.6 Obtenção do extrato enzimático

Após a fermentação, 25 mL de água destilada foram adicionados ao substrato fermentado e a mistura foi agitada em uma incubadora (QUIMIS, São Paulo, Brasil) a 30 °C e 200 rpm por 30 min. A fase líquida foi separada por prensagem mecânica, obtendo-se a permeação da gaze seguida de centrifugação (modelo CT-6000R, Cientec, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por 10 minutos a 4000 rpm para remoção das impurezas.

2.7 Determinação da atividade da endoglucanase

Foi aplicado o método baseado na medição dos açúcares redutores produzidos pela degradação de 2% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC) (Cromoline, Diadema, Brasil) diluído em 50 mM de tampão acetato em pH 5,0 (MILLER, 1959). O ácido dinitrosalicílico – DNS – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para a quantificação de açúcares redutores. Os ensaios de reação foram conduzidos pela adição de 100 µL da solução de CMC em 100 µL do extrato enzimático. Os extratos foram diluídos na proporção de 1/5. O ensaio em branco continha 100 µL de DNS (Sigma-Aldrich) e 100 µL de solução tampão.

As amostras foram incubadas em banho maria (TE-054; Tecnal) a 50 °C durante 10 min, seguidas da adição de 200 µL de DNS (Sigma-Aldrich). Posteriormente, os tubos foram submetidos a banho maria a 100°C por 5 min e a reação interrompida pela adição de 2 mL de água destilada aos tubos para medição de absorbância em 540 nm em um espectrofotômetro (UV-M51 UV/Vis; Spectrophotometer). Uma unidade internacional de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de redução de açúcares por minuto a 50°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do tempo na atividade da enzima

O gráfico de contorno obtido a partir das atividades observadas nos diferentes tempos de incubação estudados sugere que o tempo que favoreceu uma maior atividade enzimática foi 96h. Estudos com a mesma enzima obtiveram melhor atividade em 100h de fermentação em resíduo de jaca como substrato com o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (Marques, *et al.*, 2019), 70,35 h de fermentação com *Aspergillus niger* (Santos *et al.*, 2016) e 72h de incubação em casca de cacau também com *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (Oliveira *et al.*, 2019), esses autores mostraram que a composição (macro e micronutrientes) presentes no meio fermentativo e as características do fungo podem influenciar no fator tempo de incubação.

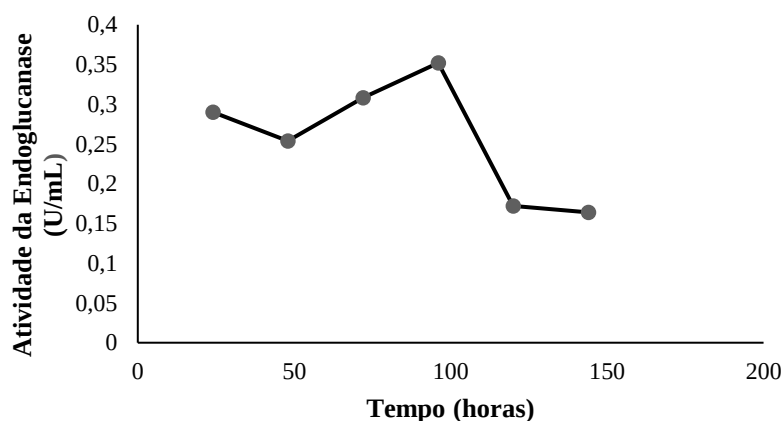


Figura 1. Efeito do tempo na produção da endoglucanase produzida pelo *Aspergillus Niger* ATCC 1004 por fermentação em estado sólido.

3.2 Otimização multivariada

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1. Os valores de resposta são o resultado médio de triplicata realizado nos ensaios de quantificação da atividade enzimática. Os efeitos das variáveis independentes (temperatura e umidade) sobre as variáveis de resposta (atividade da endoglucanase) foram analisados em um nível de confiança de 95% das respostas mostradas na tabela 2.

Para melhor visualização, gráfico Pareto e de contorno (Figura 1a e 1b) foram construídos. No gráfico de Pareto (Figura 1a) a linha vertical permite observar as variáveis cada vez menores, onde todos os termos investigados, umidade e temperatura, foram significativas para a produção da enzima, sendo a variável temperatura de maior influência. Autores como Marques *et al.*, (2019) obtiveram as melhores atividades da enzima endoglucanase em temperatura de 33 °C para o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 e Santos *et al.*, (2016) 29,56 °C com a mesma enzima com *Aspergillus niger*. Vale ressaltar que essas condições dependem de diversos fatores como o fungo estudado e as propriedades dos diferentes substratos aplicados.

No gráfico de contorno (Figura 1b) verifica-se que a maior atividade da enzima foi alcançada quando as condições foram mantidas no nível central, neste caso, a umidade de 60% e a temperatura de 28°C. Oliveira *et al.*, (2019), para casca de cacau, verificou a maior atividade da endoglucanase nas condições de temperatura de 30 °C, próximo ao observado nesse estudo. O fator temperatura é fundamental para a condução de massa e transporte de oxigênio, por isso tem influência no crescimento do fungo e na produção da enzima. Baixas temperaturas afetam o desenvolvimento microbiano reduzindo a produção enzimática, enquanto que altas temperaturas faz com que os microrganismos limitam a energia obtida do substrato para sintetizar apenas uma pequena quantidade de proteínas necessárias para seu crescimento e processos fisiológicos, além de levar a desnaturação da proteína causando alteração na sua estrutura dimensional. (Brito *et al.*, 2017 e Oliveira *et al.*, 2019),

Estudos com *Aspergillus Oryzae* ATCC 10124 aplicado em FES com cascas de amendoim e arroz, verificaram melhor atividade da endoglucanase nas condições de temperatura de 33 e 36°C e umidade de 50 a 60 %, próximos dos observados nessa pesquisa. É considerável dizer que em baixa umidade ocorre a redução da difusão de nutrientes no meio o que afeta, negativamente, o crescimento microbiano. Alta umidade pode provocar a formação de agregados de partículas devido a atenuação drástica da porosidade do substrato, interferindo na disponibilidade de oxigênio para o fungo (Brito, *et al.*, 2017).

Tabela 2. Análise de variância para o modelo quadrático (Planejamento Doehlert) aplicado na otimização das condições experimentais

Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	Valor p	R ²
Regressão	0,023	5	0,005	21,40	0,01	0,973
Falta de ajuste	0,001	1	0,001	0,60	0,52	
Erro puro	0,001	2	0,001			
Total	0,025	8				

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R²),

*Nível de confiança de 95%

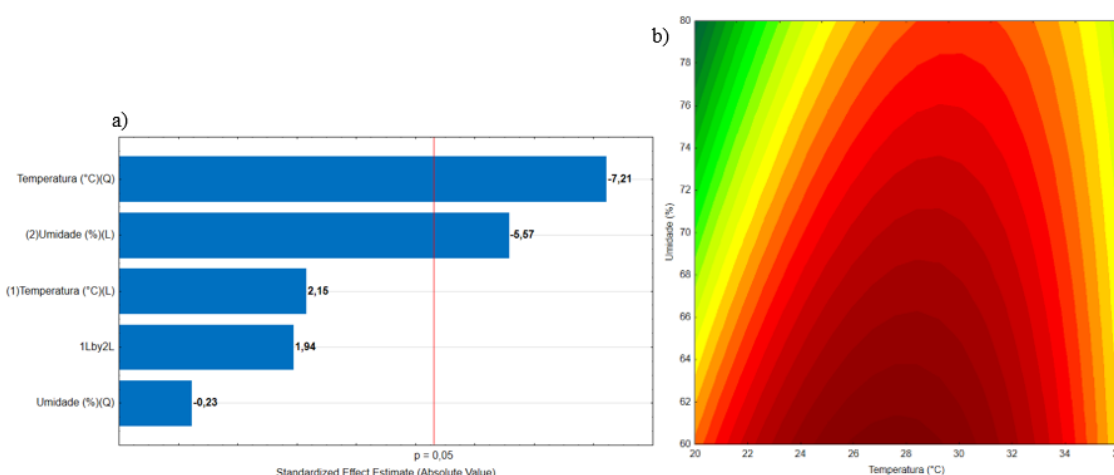


Figura 1. Gráfico pareto (a) e gráfico de contorno (b) representando interações entre variáveis tendo como resposta à atividade de endoglucanase, obtidas a partir do modelo quadrático em Planejamento Doehlert: temperatura x umidade

4. CONCLUSÃO

A aplicação do Planejamento Doehlert foi eficaz para a pesquisa, uma vez que foi possível avaliar os fatores desejados com confiabilidade e praticidade. Esse tipo de metodologia possibilitou identificar a influência de dois fatores com pequeno número de experimentos, tempo e materiais. Os resultados mostraram a influência dos parâmetros de tempo, temperatura e umidade no desenvolvimento do fungo, permitindo definir as condições ótimas (96h, 28°C e 60%) para a máxima atividade da enzima.

5. AGRADECIMENTOS

A FAPESB pelo apoio financeiro, a UESB e UESC pelo pela oportunidade e condições de realização do trabalho e ao LABIOCAT por todo acolhimento e conhecimento compartilhado.

6. REFERÊNCIAS

BRITO, A.R., SANTOS, R.N., SILVA, T.P., BONOMO, F.R.C., UETANABARO, T.A.P., ASSIS, S.A., SILVA, E.G.P., AGUIAR-OLIVEIRA, E., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization



of the endoglucanase produced in the solid state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 47, p. 977–985, 2017.

CARVALHO, M.S., MENEZES, L.H.S., PIMENTEL, A.B., COSTA, F.S., OLIVEIRA, P.C., SANTOS, M.M.O., TAVARES, I.M.C., IRFAN, M., BILAL, M., DIAS, J.C.T., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. *Waste and Biomass Valorization*, v. 13, p. 1 a 11, 2022.

CERQUEIRA, U.M.F.M., BEZERRA, M.A., FERREIRA, S.L.C., ARAÚJO, R.J., SILVA, B.N., NOVAES, C.G. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. *Food Chemistry*, v. 364, p. 130429, 2021.

HODA, A., TAJAF, M., SALLAKU, E. In silico Structural, Functional and Phylogenetic Analyses of cellulase from *Ruminococcus albus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, p. 58, 2021.

MARQUES, G.L.L., SILVA, T.P., LESSA, O.A., BRITO, A.R., REIS, N.S., FERNANDES, A. G., FERREIRA, M.L.O., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Production of xylanase and endoglucanase by solid-state fermentation of jackfruit residue. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 18, p. 673–680, 2019.

MILLER, G.L. Uso de reagente ácido dinitrosalicílico para determinação de açúcar redutor. *Analítico Química*, v. 31, n. 2, pág. 426-428, 1959.

NEVES, C.A., MENEZES, L.H.S., SOARES, G.A., REIS, N.S., TAVARES, I.M.C., FRANCO, M., OLIVEIRA, J.R. Production and biochemical characterization of halotolerant β -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 12, p. 3133-3144, 2020.

NUNES, N.S., CARNEIRO, L.L., MENEZES, L.H.S., CARVALHO, M.S., PIMENTEL, A.B., SILVA, T.P., PACHECO, C.S.V., TAVARES, I.M.C., SANTOS, P.H., CHAGAS, T.P., SILVA, E.G.P., OLIVEIRA, J.R., BILAL, M., FRANCO, M. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. *Bioenerg*, v. 13, p.1130-1143, 2020.

OLIVEIRA, P.C., BRITO, A.R., PIMENTEL, A.B., SOARES, G.A., PACHECO, C.S.V., SANTANA, N.B., SILVA, E.G.P., FERNANDES, A.G.A.A., FERREIRA, M.L.O.M.M.L., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v.18, p. 777–787, 2019.

SANTANA, M.L., BISPO, J.A.C., DE SENA, A.R., TESHIMA, E., DE BRITO, A.R., COSTA, F.S., FRANCO, M., DE ASSIS, S.A. Clarification of tangerine juice using cellulases from *Pseudomyces* sp. *Journal of Food Science and Technology*, v. p. 58, 44–51, 2021.

SANTOS, T.C., FILHO, G.A., BRITO, A.R., RENATA, A.J.V.P., BONOMO, C.F., FRANCO, M. Produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* e *rhizopus* sp. durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. *Revista Caatinga*, v. 29, p. 01, 2016.

SIQUEIRA, J.G.W., RODRIGUES, C., VANDENBERGHE, L.P. DE S., WOICIECHOWSKI, A.L., SOCCOL, C.R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 132, p. 105419, 2020.