



OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE β -MANANASE UTILIZANDO MATRIZ DOEHLERT

Luise de Oliveira Sena¹, Fabiane Neves Silva¹, Gabriel Lucas Silva de Jesus², Manuella Sena da Mota², João Marcos Sena Chaves², Taise Amorim Ribeiro¹, Floriatan Santos Costa³ e Marcelo Franco²

¹UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

²UESC- Universidade Estadual de Santa Cruz

³UFPR- Universidade Federal do Paraná

Email: luiseagr@gmail.com

RESUMO

A β -mananase é uma enzima responsável pela degradação da manana e pode ser produzida por fermentação em estado sólido. Para otimizar o processo fermentativo e obter um maior rendimento da enzima, é crucial considerar e ajustar vários fatores que podem influenciar o processo. O farelo de cacau, a casca de tamarindo e a ora-pro-nóbis foram empregados como substrato para produção de β -mananase utilizando o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob a técnica de fermentação em estado sólido. Uma matriz Doehlert foi utilizada para otimizar o processo fermentativo, avaliando os fatores umidade e temperatura. Verificou-se que a condição ótima determinada para máxima produção da enzima foi temperatura de 22 °C e 69% de umidade, obtendo uma atividade de 107,27 U/g. O estudo destaca a importância da otimização de parâmetros de processo para alcançar um desempenho econômico e ambientalmente sustentável na produção de enzimas.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Condições de fermentação. Enzima. Hemicelulases. *Penicillium roqueforti*.

INTRODUÇÃO

A endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) é uma enzima responsável pela quebra aleatória das ligações internas 1,4- β -manosídicas presentes na cadeia da manana, resultando na liberação de manooligossacarídeos e manose como produtos finais (Malgas et al., 2015). A β -mananase pode ser obtida por meio da fermentação em estado sólido. No entanto a fermentação pode ser afetada por diversos fatores, como umidade, tempo e temperatura (Carvalho et al., 2022). Assim, a otimização do processo fermentativo é extremamente importante para obter uma máxima produção da enzima.

A associação entre planejamentos experimentais e a metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma ferramenta poderosa. Ela possibilita a coleta econômica e eficiente de dados, a modelagem do seu comportamento por meio de funções matemáticas, a descrição da região experimental e a capacidade de fazer previsões estatísticas, identificando as condições ideais para experimentos (Cerqueira et al., 2021). Os projetos Doehlert exibem algumas vantagens, como a maior eficiência e o menor número de experimentos necessários para completar o processo de otimização (Caldas et al., 2013). Deste modo, o estudo teve por



objetivo otimizar o processo fermentativo para produção de β -mananase pelo fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, empregando uma matriz Doehlert para obter a máxima produção da enzima, tendo a umidade e temperatura como fatores analisados.

METODOLOGIA

Biomassa lignocelulósica e inóculo

A casca do tamarindo (T) foi adquirida de produtores da região de Minas Gerais, Brasil. O farelo de cacau (FC) foi fornecido pela empresa Barry Callebaut (Itabuna, Bahia, Brasil). A ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Mill) foi coletada na Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC. Todos os materiais foram secos em estufa com circulação de ar a 65 °C por 24 h e posteriormente, triturados em moinho de facas para obtenção de partículas com granulometria de 2,0 mm.

O fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, foi fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e devidamente depositado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob o número de registro: 40075 e lote: 079840075. A suspensão de esporos foi preparada após o cultivo do fungo em meio PDA e Agar-Agar durante 7 dias a ± 25 °C.

Fermentação em estado sólido e obtenção do *blend* multienzimático

O processo fermentativo foi realizado utilizando erlenmeyers de 125 mL contendo 5,5 g da mistura dos resíduos (73,27% farelo de cacau (FC); 17,64% casca de tamarindo (T); e 9,09% da biomassa ora-pro-nóbis (OPN), de acordo com o planejamento Simplex-Centróide em estudo anterior. Os materiais foram esterilizados em autoclave (121°C/1atm/ 15 minutos). Após o resfriamento, o substrato estéril foi inoculado com 10^7 esporos/grama de substrato e umedecido com água destilada estéril, até a determinação do valor de umidade desejada. Os erlenmeyers foram mantidos em incubadora BOD durante 7 dias em temperatura controlada.

O *blend* multienzimático foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada ao substrato fermentado. A mistura foi agitada em incubadora shaker a 30 °C/200rpm/30 minutos. A fase líquida foi separada por prensagem mecânica e permeação com gaze, seguida de centrifugação 10 minutos/4000 rpm.

Otimização do processo fermentativo

Após obter o substrato adequado para o processo, utilizou-se o planejamento Doehlert (DD) para estabelecer as condições adequadas de fermentação, considerando o estudo da temperatura (TP) e umidade (HD) nas faixas de 20 a 30 °C e 65 a 85%, respectivamente. A atividade enzimática (U/g) foi utilizada como resposta experimental para a obtenção dos modelos matemáticos, a estimativa dos erros e a determinação do ponto ótimo. A matriz e a resposta experimental obtidas em cada experimento estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz experimental com experimentos, a combinação dos componentes e resposta experimental

Experimento	Umidade – A (%)	Temperatura – B (°C)	Atividade (U/g)
-------------	-----------------	----------------------	-----------------



1	85 (1)	25 (0)	68,36 ± 0,006
2	80 (0,5)	30 (0,866)	73,45 ± 0,001
3	65 (-1)	25 (0)	89,18 ± 0,001
4	70 (-0,5)	20 (-0,866)	104,45 ± 0,005
5	80 (0,5)	20 (-0,866)	72,55 ± 0,002
6	70 (-0,5)	30 (-0,866)	75,45 ± 0,004
7	75 (0)	25 (0)	102,55 ± 0,001
8	75 (0)	25 (0)	98,55 ± 0,000
9	75 (0)	25 (0)	94,55 ± 0,004

U/g- Unidades por grama de substrato

Determinação da atividade de β -mananase

A atividade enzimática de β -mananase foi determinada de acordo com Karahalil et al. (2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos matemáticos foram obtidos a partir dos dados experimentais e avaliados por meio da ANOVA (Tabela 2). O modelo quadrático demonstrou o melhor ajuste aos dados experimentais e também foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Além disso, não foi observada falta de ajuste ($p > 0,05$) e a regressão apresentou alta capacidade preditiva ($R^2 = 0,962$). O modelo quadrático foi considerado adequado e utilizado para determinar os efeitos padronizados de cada fator (Figura 1A), bem como suas interações na resposta experimental e na determinação da condição ótima.

Tabela 2. Análise de variância para o modelo quadrático obtido no planejamento Doehlert

Fonte de variação	SS	Df	MS	Valor p	R ²
Regressão	18,81	5	3,76	0,023	0,962
Falta de ajuste	0,35	1	0,35	0,314	
Erro puro	0,39	2			
Total	19,55	8			

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R^2).

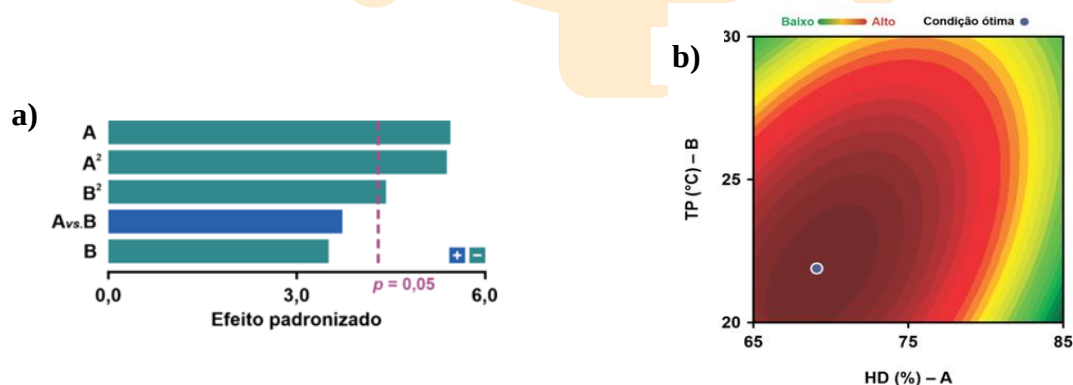


Figura 1. Efeito padronizado para os fatores investigados (A) e gráfico de contorno obtido a



VII SEMEALI – UFAM

VII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos

Tecnologias avançadas no processamento de alimentos amazônicos

18 a 20 de Outubro de 2023

Manaus, Amazonas, Brasil

partir do modelo quadrático (B).

Na Figura 1B, observamos uma região de máximo e o ponto ótimo foi obtido com as seguintes condições: umidade de 69% e temperatura de 22 °C. Aplicando esses parâmetros, o modelo prevê uma resposta experimental de 104,27 U/g. Em relação à condição não otimizada, foi determinado um aumento de 17% na atividade enzimática. Em condições otimizadas (52% umidade; 30 °C e 130h), Bangória et al. (2021), obtiveram valores superiores ao presentes estudo (4693 U/g), utilizando torta de palmiste e farelo de soja com o *Penicillium aculeatum* APS1. As discrepâncias nos resultados podem ser atribuídas à variação da cepa, as características do substrato empregado e condições de cultivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos destacam que as condições ideais identificadas no estudo para a produção da β -mananase foram umidade de 69% e temperatura de 22°C, resultando em uma atividade de 107,27 U/g. Esse estudo é uma abordagem eficaz para maximizar o rendimento da β -mananase obtida de forma mais econômica e sustentável, contribuindo para avanços futuros na aplicação industrial.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo financiamento. A UESB, UESC e LABIOCAT pela estrutura e conhecimento para realização do estudo.

REFERÊNCIAS

- CALDAS, L. F. S., DE PAULA, C. E. R., BRUM, D. M., CASSELLA, R. J. Application of a four-variables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. **Fuel**, v. 105, p. 503-511, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.026>.
- CERQUEIRA, U. M. F. M., BEZERRA, M. A., FERREIRA, S. L. C., ARAÚJO, R. DE J., DA 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130429>.
- DE CARVALHO, M. S., DE MENEZES, L. H. S., PIMENTEL, A. B., COSTA, F. S., OLIVEIRA, P. C., DOS SANTOS, M. M. O., TAVARES, I. M. DE C., IRFAN, M., BILAL, M., DIAS, J. C. T., DE 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 Biomass Valorization**, p. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01832-8>.
- KARAHALIL, E., GERMEC, M., KARAOGLAN, M., YATMAZ, E., COBAN, H. B., INAN, M., TURHAN, I. Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract, **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.10, p. 1189-1205, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00487-1>.
- MALGAS, S., DYK, S. J. V., PLETSCHEKE, B. I. β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism – A key factor for the hydrolysis of galactomannan



VII SEMEALI – UFAM

VII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos

Tecnologias avançadas no processamento de alimentos amazônicos

18 a 20 de Outubro de 2023

Manaus, Amazonas, Brasil

substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 1-8, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.007>.

