



Design experimental utilizando borra de café e *Aspergillus* sp para produção de fosfatase alcalina

Karen Andreza a Silva Xavier¹ Thayná de Souza Marães¹ Jennifer Salgado da Fonseca^{2*}
Ricardo de Lima Serudo³

Resumo

Enzimas de origem microbiana constituem aproximadamente 70% do mercado total de enzimas comercializadas atualmente, isto mostra a necessidade de estudos voltados para esta área em ascensão. Diversos fungos filamentosos têm sido explorados em processos industriais para a produção de metabolitos, inclusive na região amazônica. Fazendo uso de um planejamento fatorial composto central (2³), foi estudado a produção de fosfatase alcalina por *Aspergillus* sp, observou-se os principais fatores que afetavam o sistema de produção, ao final estes fatores foram definidos como temperatura, tempo de fermentação e pH do meio. O pico de produção obtido possui atividade superior a 8 U/mL, foi possível obter um modelo matemático, assim como uma explicação do mesmo de 83,47%. As condições ótimas para produção de fosfatase alcalina foi determinada utilizando 5g de substrato em pH 10 por dois dias. Esses valores mostram um grande potencial para produção em maior escala.

Palavras Chaves: Dinâmica microbiana, Enzima hidrolítica, Composto central.

Experimental Design using coffee ground and *Aspergillus* sp for alkaline phosphatase production. Enzymes of microbial origin constitute approximately 70% of the total market of enzymes currently commercialized this shows the necessity of studies directed to this area on the rise. Several filamentous fungi have been exploited in industrial processes to produce metabolites, including in the Amazon region. Using a central composite factorial design (2³), the production of alkaline phosphatase by *Aspergillus* sp was studied, the main factors affecting the production system were observed, in the end these factors were defined as temperature, fermentation time and pH of the medium. The obtained peak of production has activity higher than 8 U/mL, it was possible to obtain a mathematical model, as well as an explanation of the same of 83.47%. The optimum conditions for alkaline phosphatase production were determined using 5g of substrate at pH 10 for two days. These values show great potential for larger scale production.

Keywords: Microbial dynamic, Enzymes, Central composite.

¹Graduanda em Engenharia Química, da Escola Superior de Tecnologia (EST), UEA, Manaus - AM.

²Pesquisadora no HUB – Tecnologia e Inovação, UEA, Manaus - AM. E-mail: fonseca.jsd@gmail.com

³Professor Adjunto de Química, da Escola Superior de Tecnologia (EST), UEA, Manaus - AM. E-mail: rserudo@uea.edu.br



1. Introdução

Dentre as diversas formas de obtenção de enzimas, a produção microbiana é considerada superior às demais devido a fatores como: produção independente de fatores sazonais, uso de indutores de baixo custo, a possibilidade de um alto rendimento e produção relativamente simples. Esses fatores fazem com que essas enzimas constituam aproximadamente 70% do mercado total de enzimas comercializadas atualmente (NELSON, 2011; GOMES et al., 2017; MARTIN et al, 2017; SILVA et al., 2018).

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se por fungos filamentosos com hifas hialinas, septadas e ramificadas em ângulo agudo, as quais se diferenciam em estruturas reprodutivas típicas para dar origem aos conídios. Fungos filamentosos têm sido explorados em processos industriais para a produção de metabolitos. Os *Aspergillus* são utilizados para produção de enzimas tais como: xilanases, glicose oxidase, amilases, pectinase, proteases, β -glucosidase invertase e fosfatases. (POESTER et al.; 2015, GOMES et al., 2017; OLIVEIRA, 2018)

As fosfatases alcalinas são um grupo de enzimas que hidrolisam ésteres de fosfato com pH ótimo de atividade acima de 7. Pode ser utilizada como marcador genético no diagnóstico de doenças hepáticas e ósseas, assim como indicador de contaminação após a pasteurização na indústria de alimentos. Na indústria de cosméticos, é incorporada nas fórmulas a fim de estimular formação de fibroblastos na pele. Além disso, pode ser utilizada na agricultura para melhorar a fertilização do solo, pois atua no ciclo do nitrogênio. (PEREIRA e POLIZELI, 2014; ZUMÁRRAGA et al., 2016; FONSECA, 2018; LOPES et al., 2018).

Apesar da produção de enzimas de origem fúngica ser bastante estudada, ainda não há uma vasta exploração para utilização destes microrganismos isolados da Região Amazônica para a produção de enzimas hidrolíticas, principalmente, em se tratando da fosfatase alcalina. Estudos mostram que mesmo com um amplo potencial de recursos naturais na região, ainda não há um polo de desenvolvimento regional baseado em bionegócios, tornando-se um mercado aberto.

(BEZERRA et al., 2015; OLIVEIRA, et al., 2015; ARAUJO, 2018; DINIZ, 2018)

2. Material e métodos

2.1 Microrganismo

Usou-se o fungo do gênero *Aspergillus* (IL-SOL 12) presente na micoteca do Laboratório ILUM – HUB na unidade Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), onde o projeto foi desenvolvido. Os esporos foram inoculados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubados à 30°C por cinco dias.

2.2 Design experimental para produção de fosfatase alcalina

A necessidade de avaliar os efeitos de dois ou mais fatores sugerem a adoção de técnicas de experimentos fatoriais, que fornecem um estudo estatístico das interações entre os fatores de interesse. Foi usado um planejamento tipo Composto Central 2³ variando os níveis das variáveis do tempo, pH (6 – 10) e concentração do substrato com incubação fixa à 28°C e agitação de 100 rpm, obtendo como resposta a atividade enzimática de fosfatase alcalina (U/mL).

Foi utilizado borra de café da marca Manaus como fonte de carbono para a fermentação líquida, uma vez que o substrato é rico tanto em compostos orgânicos quanto minerais, não houve a necessidade do uso de um meio mínimo rico em sais, sendo uma mistura de tampão com substrato apenas.

A sequência dos experimentos, bem como as condições para cada um, foi gerada no Software Statistica versão 12.0 respeitando os níveis das variáveis propostas indicadas na Tabela 1. Os resultados obtidos foram analisados no mesmo software e demonstram as interações entre o tempo, concentração de substrato (borra de café) e pH, estimando a significância de cada variável no modelo de produção de fosfatase alcalina.

Ao todo, foram realizados 18 experimento randomicamente com quatro repetições somente para o ponto central (seis dias, pH 8 e 5% de substrato).



2.3 Dosagem quantitativa de fosfatase alcalina

A dosagem foi realizada utilizando 10,00µL de p-Nitrofenilfosfato (5mM) da Sigma-Aldrich como substrato, 35µL de amostra e 135µL da solução tampão Tris pH10. A solução foi aquecida no monobloco por 30 minutos a 37°C. Para interromper a atividade, foram utilizados 20µL de NaOH 1M. A leitura foi realizada no Espectrofotômetro Mindray MR 96A a 405 nm. Uma unidade enzimática

(U) foi definida como 1 µmol de p-nitrofenol formado por minuto por mL nas condições de ensaio.

2.4 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.

Tabela 1- Níveis das variáveis estudadas no planejamento 2³

Fatores	Valores		Níveis obtidos no planejamento estatístico				
	Mínimo	Máximo	-1,682	-1	0	+1	+1,682
	-1,682	+1,682					
Tempo (dias)	2,6	9,3	2,6	4	6	8	9,3
pH	4,6	11,3	4,6	6	8	10	11,3
Borra de café (%)	1,6	8,3	1,6	3	5	7	8,3

3. Resultados e Discussão

Após executados todos os experimentos previstos no design experimental, foram observadas grandes diferenças nas produções enzimáticas ao fazermos mudanças em algum ou em todos os fatores do planejamento, como demonstrado na Tabela 2.

Iniciando a análise dos dados estatísticos, têm-se o Diagrama de Pareto demonstrando os fatores e as interações estudadas no design experimental. Os efeitos dos parâmetros estão relacionados por ordem de significância abaixo. Apenas os fatores excedentes a linha vermelha é significativa para a resposta desejada.

Os efeitos com coeficiente positivo possuem um efeito sinérgico, ou seja, com seu incremento tem-se um aumento da atividade da fosfatase alcalina. Contrariamente, os efeitos com coeficiente negativo possuem efeito antagônico, ou seja, seu incremento diminui a atividade da fosfatase alcalina.

Analisando a Figura 1, é nota-se que o principal fator que interfere na produção das enzimas é a variação linear do tempo, seguido pela variação quadrática do pH. Segundo

HÄKKINEN (2015), o pH é um dos vários fatores ambientais que afetam a produção de proteínas por fungos. Mecanismos regulatórios garantem que as enzimas extracelulares sejam produzidas sob condições de pH nas quais o enzimas são ativas, no caso da fosfatase alcalina a faixa de pH na qual pode-se encontra-la é entre 8-11.

Apesar do aumento linear do tempo ser o fator mais significativo para o estudo, seu aumento possui efeito antagônico. Com isso, determina-se que não são necessários muitos dias de fermentação para obter uma boa atividade enzimática. Isso pode ser explicado pelo fato da fosfatase alcalina ser um metabolito secundário (TAKAHASHI et al., 2017), produzido na fase estacionária de crescimento do fungo, durante esta fase muitas outras substâncias são produzidas o que pode diminuir a atividade de enzima de interesse em longos períodos de fermentação. Este resultado é, particularmente, interessante para o escalonamento do processo, uma vez que processos que demandem um longo período não são industrialmente viáveis e nem comercialmente atrativos.

Tabela 2 – Produção de fosfatase alcalina (U/mL) por *Aspergillus* sp usando composto central (2³) para o estudo da relevância do pH, Tempo e quantidade de substrato na produção enzimática.

Experimento	pH	Tempo	Substrato (%)	Atividade enzimática (U/mL)
1	-1	-1	-1	0,852
2	-1	+1	-1	0,685
3	-1	-1	+1	3,303
4	-1	+1	+1	1,496
5	+1	-1	-1	5,316
6	+1	+1	-1	1,568
7	+1	-1	+1	4,838
8	+1	+1	+1	3,017
9	-1,682	0	0	2,082
10	+1,682	0	0	1,274
11	0	0	-1,682	0,436
12	0	0	1,682	3,847
13	0	-1,682	0	7,900
14	0	+1,682	0	2,117
15	0	0	0	9,000
16	0	0	0	8,000
17	0	0	0	8,036
18	0	0	0	10,413

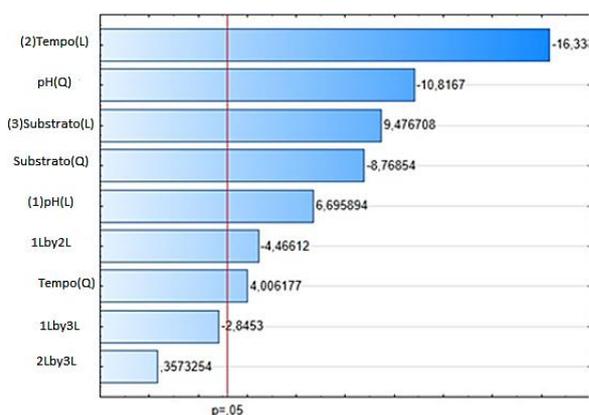


Figura 1 – Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis individuais e combinados

O terceiro fator mais significativo para o fenômeno foi a variação linear da quantidade de substrato, com efeito sinérgico. Desta forma, o aumento da quantidade de substrato garante um aumento na produção enzimática. Em alguns casos o aumento de substrato pode ter efeito inibidor (LEHNINGER, 2011), mas este fato não observado no estudo o que leva

acreditar que a enzima de interesse seja produzida logo no início da fase estacionária.

A explicação encontrada, através da análise de variância (ANOVA), para a variação do fenômeno foi de 83,47%. Apenas 13,02% das variações não puderam ser explicadas pelo modelo, mostrando que possivelmente existam efeitos que não foram estudados (Tabela 3). Com ajustes adequados a explicação do fenômeno se tornaria 99,61%. Esses valores mostram que a maior parte da variância pode ser explicada pelo modelo matemático obtido mesmo existindo uma pequena falta de ajuste.

Para validar o modelo obtido foi realizado o teste F (Equação 1). Esse é usado para medir a precisão, sendo a razão entre a variância entre os grupos e a variância dentro dos grupos (CALDO, 2003). Idealmente o valor de F calculado deve ser superior ao F tabelado. Desta forma quanto maior o valor F calculado, maior a precisão do método, pois significa que os quadrados médios do modelo são maiores que os quadrados médios residuais.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) da produção de fosfatase alcalina por *Aspergillus*.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	51,826	1	51,82613277
Resíduos	10,261	16	0,641315946
Falta de ajuste	10,018	3	3,33931217
Erro puro	0,243	13	0,018701433
Total	62,087	17	
Variável explicada (%)		83,47	
Variável explicável (%)		99,60	

$$\frac{\text{Média quadrática da regressão}}{\text{Média quadrática do resíduo}} = 80,81 \gg 4,49 = F_{1,16} \quad (\text{Equação 1})$$

Pela Tabela 1, nota-se que a média quadrática da regressão é 98,76% superior à média quadrática do resíduo, mostrando a significância da regressão ao resultar em um F calculado muito superior ao F tabelado.

Para comprovar a possível otimização do modelo, uma vez que existem variações não explicadas, foi realizado outro teste F (Equação 2). Nota-se, pela Tabela 3, que a média

quadrática é 99,44% maior que a média quadrática do erro experimental, resultando em um F calculado muito maior que o F tabelado, o que indica que é possível fazer o melhoramento dos dados obtidos.

Os testes mostram que o modelo matemático apresentado a seguir (Equação 3) possui significância, uma vez que tiveram a hipótese nula validada através do teste F.

$$\frac{\text{Média quadrática devido a falta de ajuste}}{\text{Média quadrática do erro experimental}} = 178,56 \gg 3,41 = F_{3,13} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Fosfatase alcalina} \left(\frac{U}{mL} \right) = 3,9831 + 0,5158pH - 0,8658pH^2 - 1,2582Tempo + 0,32066Tempo^2 + 0,7300Subs - 0,7018Subs^2 - 0,4495pHTempo - 0,2864pHSubs + 0,0360TempoSubs \quad (\text{Equação 3})$$

Foram plotados alguns gráficos de superfície para avaliar a interação entre alguns parâmetros. O gráfico de superfície é a aplicação da equação matemática modelada a partir dos coeficientes gerados pela estimativa dos efeitos (MILLER, 1997).

A Figura 2A mostra que para a fermentação de dois dias, a atividade da fosfatase alcalina tem seu pico em aproximadamente 7 U/mL utilizando um pH próximo de 10 e aproximadamente 7g de borra de café. Já na Figura 2B, pode-se observar que para uma fermentação de três dias o pico de atividade é levemente mais baixo próximo de 6

U/mL para um pH entre 9 e 10 e uma porcentagem de substrato entre 6% e 7%.

Através dos gráficos de superfície dispostos na Figura 3, pode-se observar que não é necessário muitos dias de fermentação para se obter uma boa atividade enzimática, confirmando os dados do teste T. Utilizando pH 10, 5g de substrato e fermentado por dois dias, pode-se obter o pico de atividade previsto pelo modelo matemático (8 U/mL).

Pela Figura 4, nota-se um pico de atividade maior que 8 U/mL para a fosfatase alcalina quando se utiliza pH 10 e fermentação de dois dias para a quantidade fixa de 5g de borra de café. Este pico de atividade é maior

que o obtido por FONSECA (2011) utilizando *Aspergillus tamarii*, 0,745 U/mL; FRANCO (2014) utilizando *Escherichia coli*, $4,85 \times 10^{-3}$

U/mL e RUBIO et al (2015) utilizando *Talaromyces flavus*, 2,24U/mL.

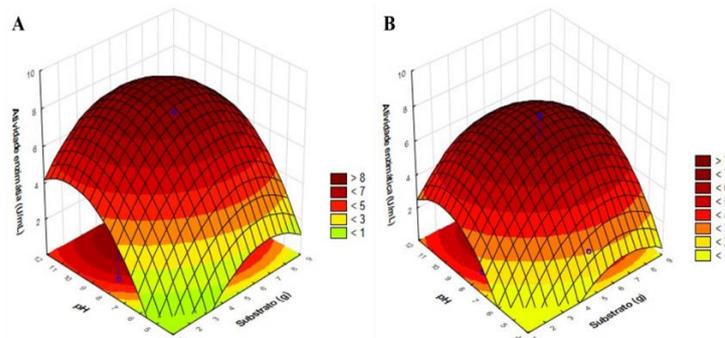


Figura 2- Produção de fosfatase alcalina a 28°C e 100 rpm durante (A) dois dias e (B) três dias com a variação de pH e substrato.

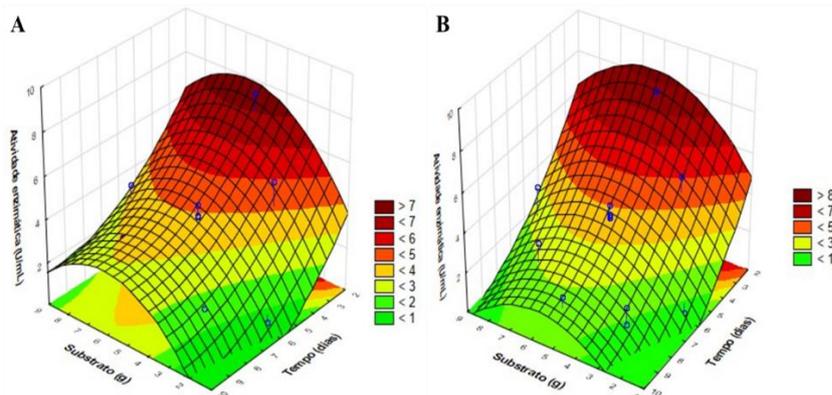


Figura 3- Produção de fosfatase alcalina a 28°C e 100 rpm em (A) pH 8 e (B) pH10 com variação de tempo e quantidade de substrato.

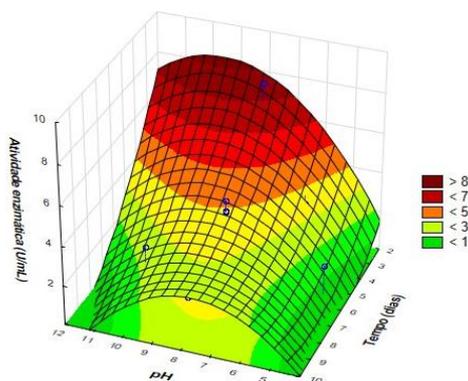


Figura 4- Produção de fosfatase alcalina a 28°C e 100 rpm com 5g de Substrato com variação de tempo e pH.

4. Conclusão

Com a análise do planejamento fatorial composto central, pode-se obter uma visão geral dos efeitos significantes a produção da

fosfatase alcalina, sendo possível modelar a mesma através de uma equação matemática e determinar as condições ótimas de produção. O método de produção mostrou-se eficaz, não necessitando de muitos dias de fermentação para se obter um pico de produção maior que o encontrado na literatura, isso mostra um potencial para escalonamento do processo.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.



Referências

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. *Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas*. Revista UNINGÁ Review. volume 21, n.1, 2015, 55-59p;
- ARAUJO, A. P. S. R.; RODRIGUES, W.; SILVA, W. S.; SOUSA, P. A. B. *Biotecnologia e Desenvolvimento Regional: O Caso da Indústria de medicamentos de uso humano e fitoterápicos no Brasil e na região da Amazônia Legal*. Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional. Volume 14, n.2, 2018, 428-454p;
- BEZERRA A.F.M. ET. AL. *Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações de biorremediação enantiosseletiva de cetonas*. Revista Diversidade Microbiana da Amazônia. Editora INPA: Manaus, 2016;
- BÜCKER, A.; SILVA, I.F.; PINHEIRO, W. D.; SOUZA, I. F.; MORAIS, L. M.; SOUZA, P. S. *Avaliação da atividade enzimática de fungos isolados do Bioma Amazônico*. Brazilian Applied Science Review. volume 2, n. 3, 2018, 779-787p;
- DINIZ, M. B.; DINIZ, M. J. T. *Exploração dos recursos da biodiversidade da Amazônia Legal: uma avaliação com base na abordagem do Sistema Nacional/Regional de Inovação*. Redes - Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul, volume 23, n. 2, 2018, 210-237p;
- FONSECA, J.S.; SILVA, L.A.O. *A utilização de resíduos de castanha do Brasil (bertholletia excelsa) como fonte de carbono para a produção de fosfatases alcalinas por Aspergillus Tamaritii*. 51º Congresso Brasileiro de Química, São Luiz- MA, 2011;
- GOMES, D.M.D.; NASCIMENTO, A.P.F.; SILVA, L.P.; AMARAL, P.A.S.; MACHADO, A.R.G.; MARTIM, S.R.; ALECRIM, M.M.; TEIXEIRA, M.F.S. *Caracterização parcial de protease alcalina produzida por Aspergillus pulverulentus em resíduo lignocelulósico*. Diversidade Microbiana da Amazônia- Editora INPA. volume 2, 2017, 171-179p;
- HÄKKINEN, M.; SIVASIDDARTHAN, D.; ARO, N.; SALOHEIO, M.; PAKULA, T. M. *The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of Trichoderma reesei*. Microbial Cell Factories, 2015;
- JATOTH, K.; SHANTIPRIYA, A.; MANGILAL, T.; JUNAPUDI, S. *Optimization for the Production of Extracellular Alkaline Phosphatase from Bacillus subtilis*. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, volume 4, n.10, 2015, 829-838p;
- KANNAIYRAM, S.; VEDHACHALAM, R.; THANIGAIMALAI, M. *Production and Characterization of Alkaline Phosphatase Produced by Bacillus Species*. Journal of Applied Biology and Biotechnology, volume 3, n.5, 2015, 031-034p;
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001, 351- 362p;
- LOPES, G. G.; VALIATTI, T. B.; ROMÃO, N. F.; MARSON, R. F.; SOBRAL, F.O.S. *Análise da eficiência e monitoramento do processo de pasteurização do leite em indústria de laticínios na região de Rondônia*. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological. Volume 5, n. 2, 2018, 5-19p;
- MARTIM, S.R.; SILVA, L.S.C.; PRADO, F.B.; MACHADO, A.R.G.; TEIXEIRA M.F.S. *Estabilidade e toxicidade de extratos proteolíticos de Pleurotus ostreatoroseus e Lentinus citrinus cultivados em resíduo lignocelulósico da Amazônia*. Diversidade Microbiana da Amazônia- Editora INPA. volume 2, 2017, 208-217p;
- MONICA, I. F. D. et al. *Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability*. Journal of Applied Microbiology, volume 124, n.1, 2017, 155-165p;
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª Ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2011;
- OLIVEIRA, J. B.; NUNES-SILVA, C. G.; SANTA-ROSA, P. S. *Determinação das Características Físico-químicas da Atividade β-glucosidase presente no Complexo Enzimático de Aspergillus versicolor*. Scientia Amazonia, S1, 2018, 94-103p;
- OLIVEIRA, L.A.; FERNANDES, O.C.; JESUS, M.A.; BENTES, J.L.S.; ANDRADE, S.L.; SOUZA, A.Q.L.; SANTOS, C. *Diversidade de Macrofungos da Família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas*.



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.2, B10-B18, 2019
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
ISSN:2238.1910

Diversidade Microbiana da Amazônia, volume 1. Editora INPA: 2016;

POESTER, V. R. et al. *Isolamento e identificação de fungos do gênero Aspergillus Spp. de água utilizada na reabilitação de Pinguins-Demagalhões*. Cienc. anim. bras., Goiânia, volume 16, n.4, 2015, 567-573p;

PREREIRA, A. T.; POLIEZI, M. L. *Caracterização bioquímica de fosfatases ácidas e alcalinas produzidas por Aspergillus thermomutatus*. SIICUSP 2014 – 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. 4p;

RUBION, P. J. S.; GODAOY, M. S.; DELLA, M. I. F.; PETTINARI, M. J.; GODEAS, A. M.; SCERVINO, J. M. *Carbon and Nitrogen Sources Influence Tricalcium Phosphate Solubilization and Extracellular Phosphatase Activity by Talaromyces flavus*. Springer Science+Business Media New York, 2015;

SILVA, B. C. R.; GOIS, I. M.; BISPO, D. F.; MARQUES, J. J.; SILVA, C. F. *Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de*

enzimas de interesse comercial. Scientia Plena, volume 14, n. 2, 2018, 1-10p;

SPECIANA, V.; ORLANDELLIA, R. C.; FELBERA, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILEA, J. A. *Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos*. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. volume16, n. 4, 2014, 345-351p;

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F. S.; GONÇALVES, F. A. G. *Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados*. Revista virtual de química. Volume 9, n. 6, 2017, 2351-2382p;

VIEIRA, S. *Estatística experimental*. São Paulo - Atlas, 2ª ed, 1999;

ZUMÁRRAGA, J. P.; BAPTISTA, A. M.; LAROSA, L. P.; UCAIERO, M. T.; CAMARGO, O. P. *Dosagem sérica de Fosfatase Alcalina e Desidrogenase Láctica no osteossarcoma*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Volume 24, n. 3, 2016, 142-146p;