

## **ESTUDO CINÉTICO DO CULTIVO DESCONTINUO DE *ASPERGILLUS AWAMORI* PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS.**

Carolayne dos Santos da Penha (PIBIC/CNPq/FA/Uem), José Eduardo Olivo (Orientador), Celise Röder (Co-autora) e-mail: jeolivo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Tecnológicas, PR.

**Engenharia Química, 30601010 PROCESSOS BIOQUÍMICOS.**

**Palavras-chave:** *Aspergillus awamori*, Amido de milho, Enzima.

### **Resumo:**

Esse projeto de pesquisa teve como intuito a produção da enzima Amiloglicosidase através do cultivo do fungo *Aspergillus awamori*, utilizando como substrato o amido de milho. O crescimento inicial no fungo era feito em placas de Petri, e posteriormente em um meio devidamente preparado para crescimento e adaptação antes de ir para o meio de fermentação, durante a fermentação o fungo ficava em um agitador rotativo com agitação de 150rpm a 30°C. Eram determinadas então a concentração de biomassa microbiana, os índices de açúcares redutores, açúcares redutores totais e a atividade enzimática, utilizando metodologias analíticas assim como a espectrofotometria. Eram analisadas também outras variáveis, como pH, temperatura e concentração de nutrientes. Em relação a temperatura, obteve-se resultados melhores de atividade enzimática para 30°C do que para 60°C. Verificou-se também que nutrientes em excesso atrapalham a produção de enzimas, visto que se obteve valores enzimáticos muito baixos no ensaio com nutrientes em excesso.

### **Introdução**

As enzimas funcionam como catalisadores em reações biológicas, as mesmas vem sendo utilizadas há muitos anos, mesmo que seu potencial biotecnológico ainda não fosse conhecido. (MONTEIRO; SILVA, 2009). Elas são amplamente utilizadas no meio industrial, sendo assim de grande importância.

Existem inúmeros fungos que agem como produtores de enzimas, entretanto destaca-se o *Aspergillus awamori* por ser um fungo filamentosos, que não apresenta toxicidade e patogenicidade, ou seja, ele é uma boa opção para indústrias alimentícias. (VIALTA 1987).

Essa pesquisa tem como objetivo estudar a cinética da produção de enzimas através do cultivo do fungo *Aspergillus awamori*, tendo como substrato o amido de milho hidrolisado, visto que o mercado de enzimas ainda é pouco explorado no Brasil e a importação de enzimas é maior do que sua exportação.

## Materiais e métodos

O microrganismo utilizado encontrava-se liofilizado, e era conservado em terra e areia e mantido sob refrigeração e, portanto, era necessário um crescimento inicial do fungo, que era feito em placas de Petri, e posteriormente em um meio líquido devidamente preparado para seu crescimento e adaptação, antes de ir para o meio de fermentação, durante a fermentação o fungo ficava em um agitador rotativo com agitação de 150rpm a 30°C.

Cabe-se ressaltar que todas as vidrarias, utensílios e meio de cultura utilizados durante os ensaios eram devidamente esterilizados em autoclave onde permaneciam por 20 min à 120°C, buscando assim minimizar as chances de contaminação durante os ensaios.

## Resultados e Discussão

Foram realizados dois ensaios simultâneos em conjunto com professora do departamento de engenharia de produção participante do projeto de pesquisa vinculado a este estudo, Celise Röder, esses ensaios tinham como intuito verificar a curva padrão de hidrólise dos açúcares redutores totais em açúcar redutor. Dessa forma no referido ensaio não se utilizou o microrganismo, e fez-se um a 60°C ao qual chamaremos de ensaio B e outro a 30°C ao qual chamaremos de ensaio A. Os dois ensaios tiveram duração de 36 horas, com amostragens feitas a cada 6 horas.

Com os dados obtidos, plotou-se os gráficos para observar melhor o comportamento das variáveis de interesse. Na figura 1, observa-se o comportamento do AR, ART, e pH com o passar do tempo para o ensaio A e B respectivamente.

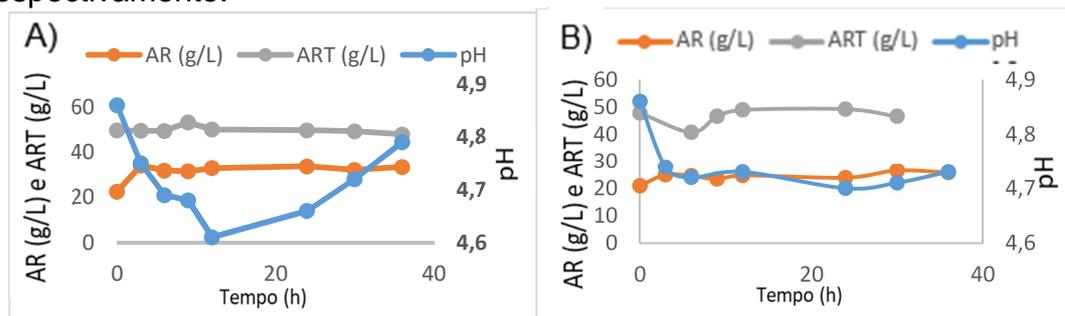


Figura 1: AR, ART e pH em função do tempo, ensaio A e B.(Fonte:Autor,2019)

Analisando as curvas de AR, pH e ART, pode-se levantar a hipótese então que a hidrólise dos ART em AR pode ser melhor se realizada a 30°C, levando em consideração que a curva de ART teve um aumento durante o ensaio B, o que não se observou no ensaio A, entretanto isso difere do encontrado em literatura, onde se diz que a faixa de temperatura ótima para a amiloglicosidase é de 50 a 60°C (COSTA,1996). Assim isso pode ter ocorrido por diversos motivos, desde contaminações, falhas mecânicas e

falhas humanas, seriam necessários alguns outros ensaios semelhantes para averiguar melhor o que foi observado.

Após a realização desse experimento se iniciou um ensaio com microrganismo com duração de 160 horas utilizando uma temperatura na fase de fermentação de 30°C, no qual se buscou testar a hipótese, levantada por Röder (2019) em sua dissertação, de que nutrientes em excesso prejudicam a produção de enzima pelo fungo. Tendo isso em vista, utilizou-se uma concentração do ART inicial de 20g/L e a concentração de nutrientes sólidos utilizada, foi o triplo do que seria habitualmente usado.

Com os resultados obtidos plotou-se o gráfico presente a figura 3, na qual é possível visualizar ao mesmo tempo o comportamento das curvas de AR, ART, pH, atividade enzimática (A) e concentração celular (X).

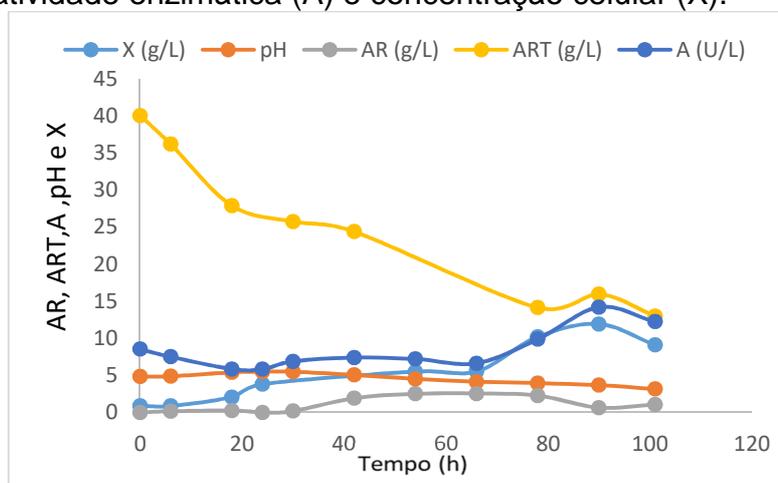


Figura 3: Comparação geral entre AR, ART, pH, atividade enzimática (A) e concentração celular (X). (Fonte: Autor, 2020).

A curva de atividade enzimática, de modo geral segue o esperado de aumentar com o decorrer do experimento, mesmo apresentando oscilações, entretanto se analisarmos os valores obtidos são extremamente baixos, o que se explica pelo os nutrientes em excesso colocados, assim como era esperado, levando a concluir que possivelmente esse fator realmente inibe a produção de enzimas pelo *Aspergillus Awamori*.

## Conclusões

Com a realização das análises e interpretação dos resultados se levantou a hipótese que a hidrólise dos ART em AR pode ser melhor se realizada a 30°C. Entretanto isso pode ter ocorrido por diversos motivos, desde contaminações, falhas mecânicas e falhas humanas, seriam necessários alguns outros ensaios semelhantes para averiguar melhor o que foi observado. Levando em consideração os valores extremamente baixos obtidos no ensaio com nutrientes, constatou-se que possivelmente esse fator realmente inibe a produção de enzimas pelo *Aspergillus Awamori*.

De modo geral a produção de enzima através do *Aspergillus awamori* utilizando o milho como substrato é possível. Entretanto ainda é uma área

que precisa de mais estudo, levando em consideração a instabilidade de um ser vivo e as inúmeras variáveis que podem interferir.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária (PR), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro. Agradeço também ao orientador desse projeto José Eduardo Olivo e a Professora do departamento de engenharia de produção participante do projeto de pesquisa vinculado a este estudo, Celise Röder, por todo o apoio e disposição em sanar minhas dúvidas durante todo o decorrer do trabalho.

## Referências

COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz.** 1996. 203f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, Goiânia, v. 3, n. 5, p.09-23, jun.2009.

RÖDER, C. **Produção de Amiloglicosidade por cultivo de *Aspergillus Awamori* NRRL 3112 em sistema descontínuo a partir do amido de milho pré-sacarificado.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Química, Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

VIALTA, A. **Genética e produção de Amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*.** 1987. 206f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.