

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH NA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA POR CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus awamori* NRRL 3112

Victor Tadashi Inoue Kussaba (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Leticia Rosa Climaco (Co-orientadora), José Eduardo Olivo (Orientador). E-mail: jeolivo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Engenharia Química /Processos Bioquímicos

Palavras-chave: Glicoamilase; Protease; Solução tampão.

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH em um meio tamponado com tampão biftalato de potássio 0,1 M no cultivo submerso de *Aspergillus awamori*. Para isso, foram realizados quatro ensaios, variando o pH inicial e as concentrações de ART da composição. Os ensaios foram realizados em incubadora por 96 horas a temperatura de 30°C e rotação de 150 rpm. As amostras foram retiradas em tempos pré-determinados e foram analisadas, assim, sendo possível observar o perfil com relação ao pH, dos AR e ART, e atividade das enzimas. Por fim, foram encontrados valores para a atividade da protease, em U/L, de 1375, 2175, 1075 e 1425 para os meios 1V, 2V, 3V e 4V, respectivamente, na marca das 72 horas. E para a glicoamilase, em U/L, de 0,1835, 0,3946, 0,0488 e 0,0961 para 1V, 2V, 3V e 4V, respectivamente, na marca das 96 horas.

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais vem mostrando um crescimento bastante expressivo nos últimos anos. Isso se dá pela ampla aplicação das enzimas como substitutos químicos (ABIPLA, 2022).

Dentre essas enzimas, algumas das mais utilizadas são as proteases e as glicoamilases. Vários microrganismos são capazes de produzi-las em um meio de cultivo, porém os fungos do gênero *Aspergillus* são especialmente reconhecidos por terem uma alta eficiência por litro de meio de cultura (LI *et al.*, 2022).

Logo, este trabalho teve como principal objetivo verificar a influência do pH em um meio de cultura tamponado.

MATERIAIS E MÉTODOS

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Aspergillus awamori* NRRL 3112, conservado em terra e areia, mantido sob refrigeração. Todos os procedimentos metodológicos, bem como análises laboratoriais foram realizadas seguindo a metodologia descrita em Röder, Climaco e Olivo (2023).

Para a ativação da cepa, preparou-se um meio Czapek modificado, onde o amido de milho pré-sacarificado foi utilizado no lugar da glicose. O meio de cultura foi composto, em g/L, por ART (30), NaNO₃ (2,0), KH₂PO₄ (1,0), MgSO₄ . 7H₂O (0,5), KCl (0,5), FeSO₄ . 7H₂O (0,01), extrato de levedura (1,0) e ágar-ágar (20).

Foi preparado também, um meio de cultivo líquido, denominado pré-inóculo (PI), para o crescimento do microrganismo em meio líquido, onde este foi inoculado com 1% (v/v) da suspensão preparada com os esporos ativos. O PI foi mantido em incubadora rotativa por 48 horas a 30°C e 150 rpm.

Após o desenvolvimento inicial em meio líquido, preparou-se os Meios de Cultivo Principal (MCP), denominados de 1V, 2V, 3V, e 4V, apresentando concentrações de ART iniciais e pH diferentes, e com suas composições de nutrientes descritas na Tabela 1. O MCP foi inoculado com 10% (v/v) do PI.

Tabela 1 – Comparação dos meios de cultivo líquido.

Substância (g/L)	PI	1V	2V	3V	4V
ART	20	20	40	20	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	10	5	10
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	3,78	3,78	7,56	3,78	7,56
KH ₂ PO ₄	3,5	3,5	7	3,5	7
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5	0,5	1	0,5	1
Extrato de Levedura	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
pH	-	5,0	5,0	4,0	4,0

Os meios de cultivo foram tamponados com solução tampão de biftalato de potássio 0,1 M. Depois, foram levados à incubadora a temperatura e rotação constante de 30°C e 150 rpm, respectivamente, por um período de 96 horas.

As amostras foram retiradas em tempos pré-determinados e foram analisados o pH, concentração de biomassa (X), açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores (AR), atividade de protease e atividade de glicoamilase, todas seguindo as metodologias descritas em Röder, Climaco e Olivo (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram como meios tamponados contendo concentrações de nutrientes e pH iniciais distintos alteram o consumo de AR e ART, o desenvolvimento dos fungos, o pH do meio, e as atividades das enzimas protease e glicoamilase. Como previamente descrito, foram analisados quatro meios distintos, sendo eles 1V, 2V, 3V e 4V, para cada um dos ensaios foi construído um gráfico contendo todas as curvas de interesse.

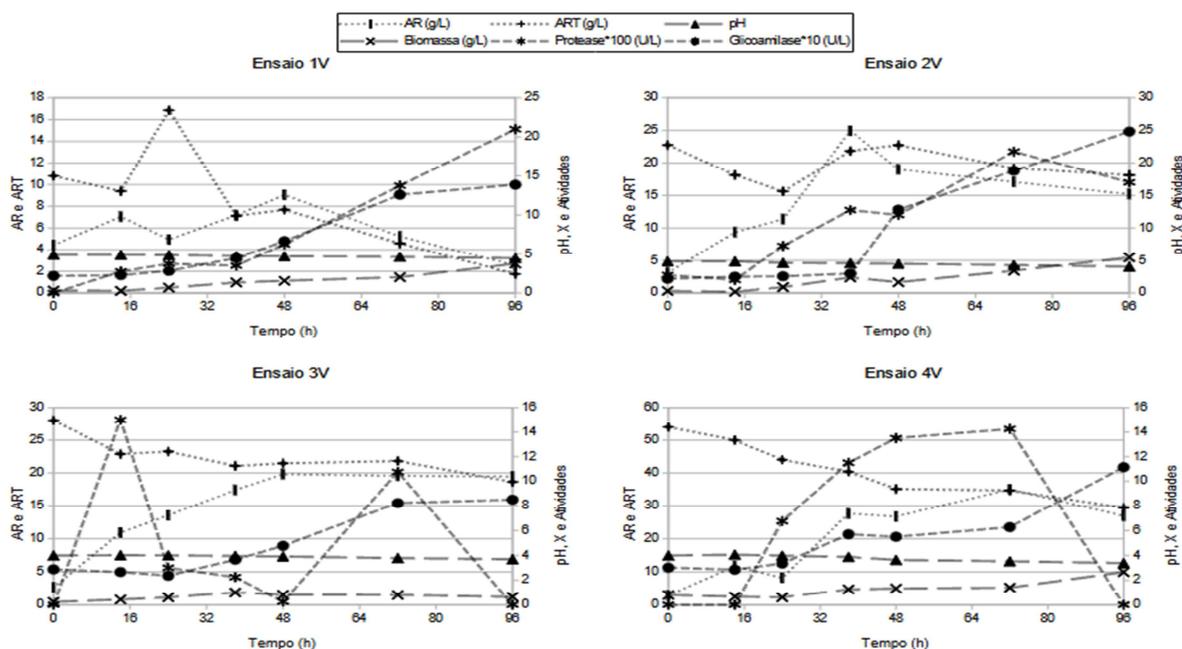


Figura 1 – Perfil de AR, ART, Biomassa, Atividade de Glicoamilase e Atividade de Protease em relação ao tempo, para os ensaios 1V (pH 5,0 e ART inicial 20 g/L), 2V (pH 5,0 e ART inicial 40 g/L), 3V (pH 4,0 e ART inicial 20 g/L) e 4V (pH 4,0 e ART inicial 40 g/L).

Ao verificar as curvas de pH, verificou-se que em todos os meios tiveram uma baixa variação devido a utilização da solução tampão na composição, porém os meios 1V e 3V, tiveram uma queda menor em relação aos outros dois. Além disso, em relação

a concentração de biomassa, observa-se que os meios com pH mais ácido apresentaram um crescimento menos expressivo do microrganismo.

Seguindo para os perfis de AR e ART, em todos os meios houve uma boa conversão de ART em AR, mas o único que apresentou um consumo significativo foi o meio 1V. Ao analisar as atividades de protease, observa-se que na marca das 72 horas, foi aparente que os meios 2V (2175 U/L) e 4V (1425 U/L) apresentaram atividades mais expressivas em relação aos meios 1V (1375 U/L) e 3V (1075 U/L). Por fim, os dados de atividade da enzima glicoamilase, assim como os da protease, também expressaram valores maiores de atividade nos meios 2V (248 U/L) e 4V (111 U/L) se comparados aos meios 1V (138 U/L) e 3V (85 U/L). Pelos valores encontrados, observa-se que os meios a pH 5,0 tiveram uma atividade superior aos de pH 4,0.

CONCLUSÕES

Em relação aos resultados obtidos, foi possível concluir que a concentração dos nutrientes, bem como o pH inicial do meio, influenciam no cultivo submerso do microrganismo. Os meios com pH mais ácido apresentaram um crescimento do fungo inferior aos outros, bem como as atividades de ambas as enzimas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à instituição UEM e ao CNPq pelo apoio financeiro dado para que fosse possível a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABIPLA. **A indústria mundial de enzimas está projetada para atingir US \$ 16,9 bilhões até 2027.** ABIPLA 2022. Disponível em: <https://abipla.org.br/a-industria-mundial-de-enzimas-esta-projetada-para-atingir-us-169-bilhoes-ate-2027/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

LI, Q.; LU, J.; ZHANG, G.; LIU, S.; ZHOU, J.; DU, G.; & CHEN, J. **Recent advances in the development of *Aspergillus* for protein production.** *Bioresource Technology*, 348, 126768. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126768>. Acesso em: 29 jul. 2023.

RÖDER, C.; CLIMACO, L. R.; OLIVO, J. E. **Influência da concentração de fosfato no meio de cultivo para síntese simultânea de proteases e amiloglicosidases**

32º Encontro Anual de Iniciação Científica
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023

em cultivo submerso de *Aspergillus awamori*. III Web Encontro Nacional de Engenharia Química, Evento online, 2023. Acesso em 28 ago. 2023.