

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE SUBSTRATO NA 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; Substrato.

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes fontes de substratos em um meio de cultura tamponado no cultivo submerso de *Aspergillus awamori*. Para tal, foram realizados seis ensaios, variando as fontes de açúcares e as concentrações iniciais dos nutrientes. Esses foram realizados em incubadora por 96 horas a 30°C e 150 rpm. As amostras retiradas em certos intervalos de tempos foram analisadas, avaliando o perfil com relação ao pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais, e as atividades enzimáticas. Por fim, em 96 horas de cultivo, foram encontrados valores para a atividade da protease, em U/L, dos ensaios L1 (8950), L2 (7900), M1 (650) e M2 (1975), F2 (5950) e T2 (13475). E para a glicoamilase, em U/L, em L1 (632), L2 (890), M1 (197), M2 (371), F2 (308) e T2 (419). Dessa forma, foi possível identificar a influência das fontes de carbono em relação à atividade enzimática de protease e glicoamilase.

INTRODUÇÃO

As enzimas, em sua maioria, são proteínas que possuem como principal função a catálise, ou seja, elas determinam a taxa ou a velocidade das reações químicas sem interferirem nos compostos reagidos (BAILEY *et al.*, 1986).

Essas enzimas possuem diversas aplicações industriais e laboratoriais, e sua utilização nestes vêm crescendo significativamente nos últimos anos. Duas das enzimas mais aplicadas são a protease e a glicoamilase. A obtenção dessas enzimas pode ser realizada a partir de um meio de cultivo contendo certos microrganismos, dentre eles, os fungos do gênero *Aspergillus* são especialmente conhecidos por uma alta eficiência por litro de meio de cultura (LI *et al.*, 2022).

Nesse sentido, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a atividade enzimática de protease e glicoamilase em cultivo em meio líquido do microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112, ao alterar as fontes de substrato.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foi utilizado o microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Para a ativação da cepa, preparou-se um meio Czapek modificado, levando o amido de milho pré-sacarificado em vez da glicose. A composição deste meio, bem como todos os procedimentos metodológicos e as metodologias analíticas foram realizadas seguindo o descrito em Röder, Climaco e Olivo (2023).

Além disso, para realizar uma ambientação do microrganismo para o meio líquido, preparou-se também um meio líquido, denominado pré-inóculo (PI). O mesmo foi inoculado com 1% (v/v) da suspensão preparada com os esporos ativos e foi mantido em incubadora rotativa por 48 horas a 30°C e 150 rpm.

Alcançado esse desenvolvimento inicial em meio líquido, preparou-se os Meios de Cultivo Principal (MCP), denominados L1, L2, M1, M2, F2 e T2, apresentando fontes de açúcares redutores totais (ART) diferentes sendo, respectivamente, 50% lactose e 50% amido de milho (L1 e L2), 50% mel invertido e 50% amido de milho (M1 e M2), fécula de mandioca (F2) e farinha de trigo (T2), todos foram previamente hidrolisadas, exceto a lactose e o mel invertido. A composição dos meios de numeração "1" foi, em g/L, ART (20), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3,78), KH_2PO_4 (3,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), extrato de levedura (0,1), enquanto que os meios de numeração "2" tiveram a mesma composição de nutrientes com concentração dobrada.

Os meios foram tamponados com solução tampão biftalato de potássio 0,1 M e tiveram seu pH ajustado para 5,0. Os mesmos foram inoculados com 10% (v/v) do PI e 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, a concentração de biomassa (X), os açúcares redutores (AR), os ART, a atividade de protease e a 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 diferentes fontes substrato, 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 seis meios distintos e para cada um dos ensaios foi construído um gráfico, os quais foram representados na Figura 1.

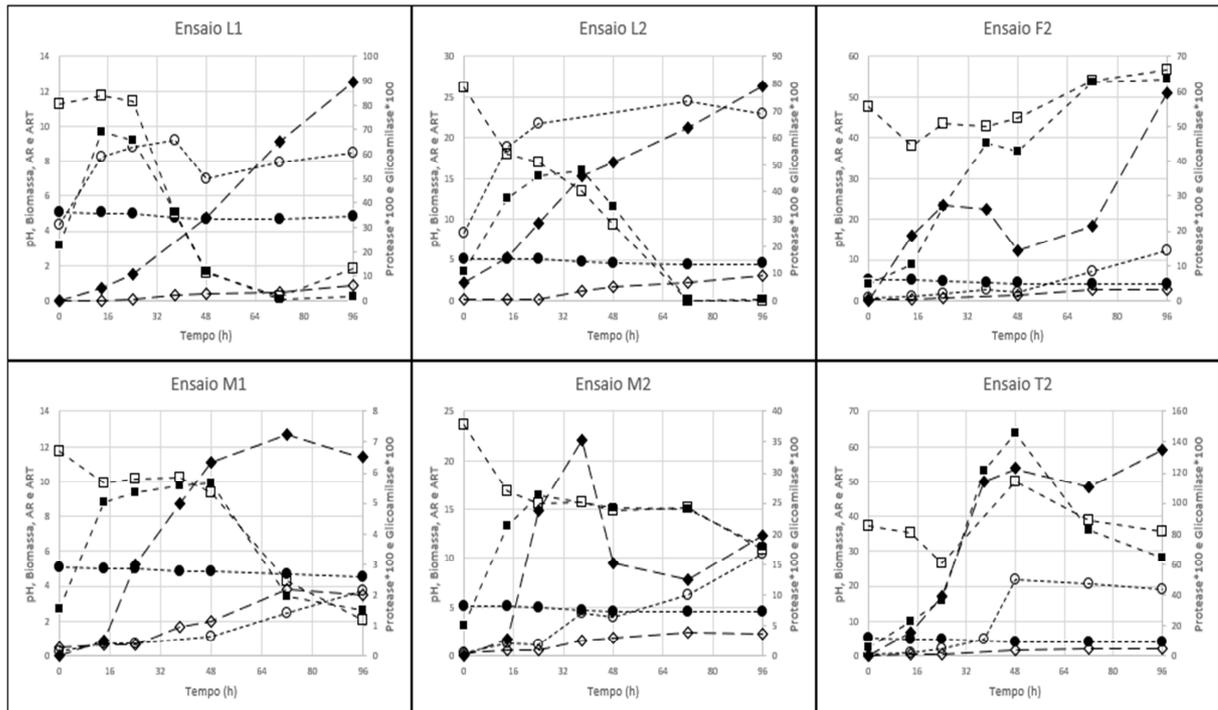


Figura 1 – Perfil de pH (●), Biomassa (○), AR (■), ART (□), Atividade de Protease (◆) e Atividade de Glicoamilase (◇) em relação ao tempo, para os ensaios L1 e L2 (Lactose), M1 e M2 (Mel invertido), F2 (Fécula de Mandioca) e T2 (Farinha de Trigo).

Ao verificar as curvas de pH, notou-se que em todos os meios tiveram uma baixa variação devido a utilização da solução tampão na composição, porém o meio L1 teve uma queda menor em relação aos demais. Além disso, em relação a concentração de biomassa, observa-se que os meios com maior concentração de nutrientes tiveram um maior desenvolvimento, destacando o ensaio L2.

Para os perfis de AR e ART, em todos os meios houve uma boa conversão de ART em AR, e o consumo ocorreu de forma mais expressiva nos ensaios L1, L2 e M1.

Ao analisar as atividades de protease, observa-se que na marca das 96 horas, foi aparente que os meios L1 (8950 U/L), L2 (7900 U/L), F2 (5950 U/L) e T2 (13475 U/L) apresentaram atividades mais expressivas em relação aos meios contendo o mel invertido, M1 (650 U/L) e M2 (1975 U/L). Por fim, os dados de atividade da enzima glicoamilase, os ensaios contendo a lactose, L1 (632 U/L) e L2 (890 U/L)

apresentaram valores superiores aos outros ensaios, sendo eles, M1 (197 U/L), M2 (371 U/L), F2 (308 U/L) e T2 (419 U/L). Pelo comportamento enzimático dos ensaios, a atividade da protease se apresentou bastante superior à da glicoamilase, podendo ter ocorrido uma inibição da segunda pela grande quantidade produzida da primeira.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram analisados a influência das fontes de ART, utilizando um meio de cultura tamponado, que compõem um meio de cultivo sobre a conversão e consumo de ART e AR, as mudanças de pH, o aumento da biomassa e as atividades enzimáticas.

Em relação à variação de pH, crescimento de biomassa e conversão de ART em AR, todos os ensaios apresentaram comportamentos parecidos, com exceção do consumo de substrato observado nos meios L1, L2 e M1, que foram significativamente superiores aos outros.

Para as atividades enzimáticas, observou-se em todos os ensaios uma maior atividade de protease, sendo valores relativamente altos, em particular no ensaio T2 (farinha de trigo). Em contrapartida, a atividade da enzima glicoamilase apresentou valores baixos, sendo o maior deles apresentado pelo ensaio L2 (lactose).

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

Bailey, J. E., & Ollis, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. McGraw-Hill Science, Engineering & Mathematics. 1986. Acesso em: 29 jul. 2024.

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. 2024.

RÖDER, C.; CLIMACO, L. R.; OLIVO, J. E. **Influência da concentração de fosfato no meio de cultivo para síntese simultânea de proteases e amiloglicosidases em cultivo submerso de *Aspergillus awamori***. III Web Encontro Nacional de Engenharia Química, Evento online, 2023. Acesso em 20 ago. 2024.