

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA SÍNTESE SIMULTÂNEA DE PROTEASES E AMILOGLICOSIDASE EM CULTIVO SUBMERSO DE *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 COM PRÉ-SACARIFICADO DE AMIDO DE MILHO

INFLUENCE OF SUBSTRATE CONCENTRATION ON THE SIMULTANEOUS SYNTHESIS OF PROTEASES AND AMYLOGLICOSIDASE IN SUBMERGED CULTURE OF *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 WITH CORN STARCH PRE-SACCARIFIED

Leticia Rosa Climaco*

Celise Roder*

José Eduardo Olivo*

Resumo: O presente estudo avaliou a influência que a concentração inicial de substrato teve no cultivo submerso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, para a síntese de amiloglicosidase e protease, com o amido de milho pré-sacarificado. Realizaram-se dois ensaios, analisando, entre outros, as taxas de bioconversão. Os resultados indicaram que o ensaio realizado com maior concentração inicial de substrato apresentou melhor desempenho, com valores como $Y_{(AMG/S)}$ e $Y_{(PTS/S)}$ de 33,43 e 294,64 U/g respectivamente.

Palavras-chaves: glicoamilase; peptidase; *Aspergillus*; amido de milho.

Abstract: The present study evaluated the influence that the initial substrate concentration had in the submerged culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112, for the synthesis of amyloglucosidase and protease, with pre-saccharified corn starch. Two assays were carried out, analyzing, among others, the rates of bioconversion. The results indicated that the assay performed with the highest initial substrate concentration presented better performance, with values such as $Y_{(AMG/S)}$ and $Y_{(PTS/S)}$ of 33.43 and 294.64 U/g respectively.

Keywords: glucoamylase; peptidase; *Aspergillus*; corn starch.

1 Introdução

Enzimas em geral possuem uma grande importância industrial. As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas. Em relação à classificação, esta é uma peptidase (EC 3.4), podendo ser dividida em endopeptidases e exopeptidases, classificação esta que ocorre de acordo com a posição da ligação peptídica clivada. As proteases extracelulares atuam na hidrólise de proteínas em pequenas cadeias peptídicas e aminoácidos para posterior absorção dos nutrientes pelas células, um importante passo do metabolismo do nitrogênio (Souza *et al*, 2015).

*Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UEM

As enzimas proteolíticas de origem fúngica possuem vantagem em relação às bacterianas, já que os micélios formados no cultivo podem ser facilmente removidos do meio pela filtração, o que não é possível com as proteases bacterianas (Souza *et al*, 2015).

A Amiloglicosidase é uma exoenzima que remove unidades de glicose de forma sucessiva em ligações α -1-4 e α -1-6 do amido, sendo que o produto formado é a glicose. A amiloglicosidase age sobre a amilose e amilopectina do amido, como também nas moléculas de maltose, dextrinas e glicogênio. Como é uma enzima de indução necessita da disponibilidade de maltose ou amido no meio de cultivo para que apresente uma alta produção (Spier, 2005; Fani, 2014).

O *Aspergillus awamori*, é um fungo filamentosos de grande interesse industrial na produção de enzimas como a amiloglicosidase, α -amilase e proteases. Além da produtividade bastante estabelecida, este microrganismo também tem a vantagem de ser considerado não patogênico e conseqüentemente seguro para a produção de alimentos destinados ao consumo humano (Cui *et al*, 1998). Os fungos, incluindo o *Aspergillus awamori*, obtêm os nutrientes por meio da absorção. Enzimas são secretadas no meio e tem por função hidrolisar o substrato disponível, deixando a disposição os nutrientes e os produtos da degradação para absorção dos fungos (Silva; Coelho, 2006).

Como fonte de carbono no meio de cultivo, pode-se utilizar o amido de milho. A molécula do amido é composta por unidades repetitivas de α -D-glicose, sendo a amilose (Figura 1a) a que possui uma cadeia simples, com ligações glicosídicas α -1,4 e a amilopectina (Figura 1b) uma cadeia mais complexa, com ramificações e ligações α -1,4 e α -1,6. O amido de milho comercial possui em sua composição uma proporção de 72 % de amilopectina para 28 % de amilose (Corradini *et al*, 2007; Fani, 2013).

As condições de cultivo no processo de síntese enzimática como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH são extremamente relevantes para bons resultados na produção enzimática, destacando-se a composição do meio. A síntese de proteases, por exemplo, pode ser significativamente melhorada quando há insuficiência nos níveis de carbono, nitrogênio e enxofre (Souza *et al*, 2015; Blieva, 2019).

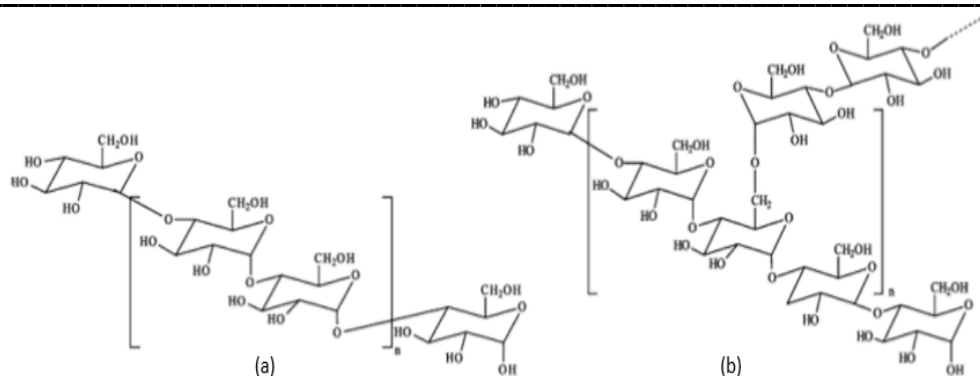


Figura 1 – Estrutura química do amido; (a) amilose e (b) amilopectina. Adaptado de Costa e Bardi (2019).

A produção de enzimas extracelulares é extremamente influenciada por condições físico-químicas, assim os parâmetros de cultivo devem ser otimizados para que sejam alcançados melhores resultados. A busca por processos mais eficientes e de menores custos impulsiona o estudo por processos que sejam capazes de sintetizar múltiplas enzimas em um único cultivo (Negi; Banerjee, 2006; Negi *et al*, 2011).

Exemplos disso são as produções concomitantes de amilases e proteases que são utilizadas nas indústrias farmacêuticas, têxteis, papel e destilação. Outro exemplo é a síntese de amiloglicosidase e proteases, que combinadas em um único processo fermentativo se tornam uteis nas indústrias de detergente, bioetanol e ração (Negi; Banerjee, 2006; Negi *et al*, 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da concentração inicial de substrato na síntese simultânea de amiloglicosidase e protease em cultivo submerso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 com pré-sacarificado de amido de milho.

2 Materiais e Métodos

2.1. Microorganismo e Propriedade intelectual

Neste estudo foi utilizado o fungo *Aspergillus awamori* NRRL 3112 adquirido do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL). A cepa do microorganismo foi conservada em terra e areia em tubos de ensaios refrigerados a 5° C, conforme a metodologia de Greene e Fred (1934) e adaptada por Facciotti (1986).

2.2. Pré-sacarificação do Amido de Milho

O amido de milho pré-sacarificado foi utilizado como fonte de carbono nos meios de cultivo. Para isso, preparou-se uma suspensão de amido de milho a 100 g/L em solução de CaCl_2 0,01

M, seguido pela correção do pH a uma faixa de 5,5 a 7,0 utilizando NaOH 1 M quando necessário.

A suspensão foi levada para aquecimento em agitação constante e em 58° C foi adicionado a α -amilase bacteriana Liquozyme Supra 2.2X da Novozymes®, e mantida em 90 °C por uma hora, quando a temperatura foi elevada a 95 °C por 5 minutos para inativação da enzima. Depois de resfriado o material foi filtrado a vácuo, e deste foram dosadas as concentrações de Açúcares Redutores Totais (ART) e os Açúcares Redutores (AR), utilizando a metodologia descrita no item Métodos Analíticos deste trabalho.

2.3. Ativação da Cepa

Para a esporulação do microrganismo foi preparado o meio Czapek modificado, sendo a glicose substituída pelo pré-hidrolisado, contendo em g/L: ART - 30, NaNO₃ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄.7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO₄.7H₂O – 0,01; Extrato de levedura – 1,0; ágar-ágar – 20. A incubação se deu a 37 °C por 7 dias.

2.4. Condições de cultivo

Foram preparados dois meios de cultivo, o denominado pré-inóculo (PI) que objetiva o crescimento do microrganismo em meio líquido e o meio de cultivo principal (MCP) para síntese das enzimas. Os ensaios (A e B) apresentados neste estudo possuem a mesma composição de nutrientes, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos Meios de Cultura

Substância (g/L)	PI	A	B
ART	20	20	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	10	10
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,78	7,56	7,56
KH ₂ PO ₄	3,50	7	7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50	1	1
Extrato de Levedura	0,10	0,20	0,20

Depois do completo desenvolvimento dos esporos as placas foram raspadas com auxílio da solução Tween®80 a 15 g/L, e uma porção de 1 mL desta solução foi adicionada a 100 mL de PI e levada a incubadora rotativa por 72 h a 30 °C e 150 rpm. Terminada a fase de desenvolvimento do fungo em meio líquido, este foi transferido para o cultivo principal, em uma proporção de 10% (100 mL de PI em 1 L de MCP). O MCP foi mantido em agitador rotativo em 150 rpm a 30 °C.

2.5. Métodos Analíticos

2.5.1.pH

O pH das amostras foi mensurado utilizando o pH METER TEC-2 da empresa TECNAL.

2.5.2.Determinação da Concentração de Biomassa (X)

Na concentração de biomassa (X), foi utilizado o material retido da filtração da amostra. O método de secagem em estufa a 60 °C foi empregado, até obtenção de massa constante de acordo com a metodologia de Olivo (1998).

2.5.3.Determinação de Açúcares Redutores (AR)

Utilizou-se o método enzimático para a determinação da concentração de AR, com o reagente enzimático colorimétrico da Biolíquid® conforme descrito em Climaco (2019).

2.5.4.Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

A determinação do ART se deu por meio da hidrólise enzimática por amiloglicosidase dos polissacarídeos presentes no filtrado da amostra, como apresentado em Roder (2019).

2.5.5.Determinação da Atividade da Amiloglicosidase (AMG)

O filtrado da amostra foi empregado na hidrólise de uma solução de amido solúvel a 4 % para a determinação da atividade da amiloglicosidase, como mostra Olivo (1998).

2.5.6.Determinação da Atividade da Protease (PTS)

A metodologia utilizada para mensurar a atividade da Protease baseou-se em Charney e Tomarelli (1947) adaptado por de Castro *et al* (2015). A leitura da intensidade de cor foi realizada em espectrofotômetro a 430 nm.

Entende-se por atividade da protease como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,001 /min na absorbância entre o branco reacional e a amostra.

2.6. Parâmetros de Bioconversão

2.6.1.Fatores de Conversão e Produtividade das Enzimas

Os fatores de conversão ($Y_{enzima/s}$) expressam a relação entre a concentração de substrato com a atividade enzimática máxima. É calculado como mostra a Equação 1, onde P_m e P_0 são as atividades máxima e inicial respectivamente, U/L, e S_0 e S_m são a concentração inicial e a referente à atividade máxima, g/L.

$$Y_{enzima/s} = \frac{P_m - P_0}{S_0 - S_m} \quad (1)$$

Os índices de produtividade (P_{enzima}) (Equação 2), ilustram a variação máxima da atividade enzimática, sendo P_m a atividade máxima (U/L) e P_0 a atividade inicial (U/L), em relação ao tempo (t_m).

$$P_{enzima} = \frac{P_m - P_0}{t_m} \quad (2)$$

2.6.2. Fator de Conversão de Biomassa

O fator de conversão da Equação 3, relaciona a variação entre a concentração final (X_f) e inicial (X_0) de biomassa (g/L) com o consumo de substrato, onde S_0 e S_f são as concentrações inicial e final (g/L) respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3)$$

3 Resultados e discussões

O substrato utilizado neste estudo como fonte de ART foi o amido de milho comercial que possui em sua composição 85,5 % de carboidratos e 0,65 % de proteínas, conforme TBCA (2020). Sabe-se que no amido de milho comercial a proporção de amilopectina é 2,5 vezes maior que a de amilose, assim quando se aumenta a concentração de amido, consequentemente eleva-se também a quantidade de moléculas complexas, dificultando a hidrólise, como pode ser observado na Figura 2a.

Percebe-se que no Ensaio B há um consumo mais lento de ART quando comparado ao ensaio A. Somente no tempo de 25 horas no ensaio B, se deu o início do consumo do ART e simultaneamente aumento na concentração de biomassa (Figura 2b).

Em relação ao pH é possível perceber uma relação de consonância com o observado no perfil de consumo do ART. No experimento A, há diminuição no pH (Figura 2c) no mesmo período que corresponde ao acentuado consumo de ART. No Ensaio B, tal paridade também é percebida, já que há pouca variação no pH nas primeiras 25 horas, assim como acontece com o consumo do ART.

O consumo do ART não mostrou grandes alterações em B a partir das 42 h, mesmo tendo AMG disponível no meio para realizar a hidrólise e disponibilizar glicose para nutrição do fungo. Porém como o pH neste tempo encontrava-se abaixo da faixa ótima de atuação (4-5) houve inibição da AMG (Spier, 2005). Ao mesmo tempo há síntese de proteases, pois sem

glicose disponível, o fungo buscou outras fontes de nutrientes para seu crescimento, como os aminoácidos que compõem as proteínas disponíveis no meio de cultivo.

Como havia atividade da AMG no início do experimento A, proveniente do PI, esta foi suficiente para sacarificar o ART antes que o pH saísse da faixa ótima de atuação. Na falta de AR disponível para crescimento da biomassa, novamente é observado que o fungo sintetiza protease na busca por outros nutrientes.

Os resultados obtidos nos índices de bioconversão podem ser visualizados na Tabela 2, onde fica perceptível a relevância que $Y_{X/S}$ tem na P_{enzima} . Para a protease observa-se que o menor $Y_{X/S}$ favoreceu a uma maior produtividade enzimática, já para a AMG a relação é inversa, quanto maior a $Y_{X/S}$ maior a produtividade da enzima.

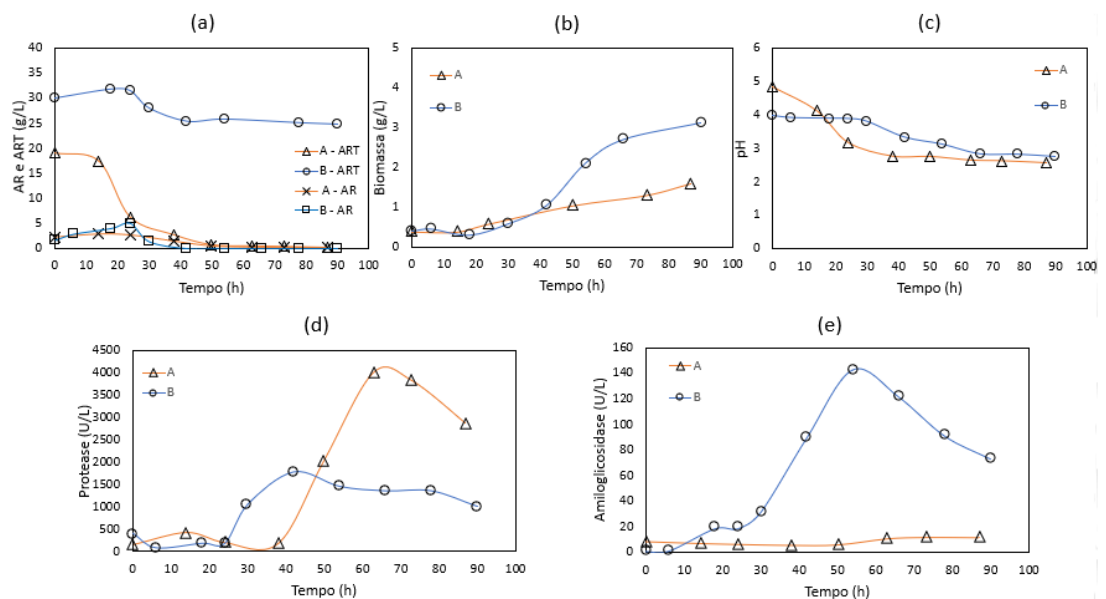


Figura 2 - Perfil de ART e AR (a), Biomassa (b), pH (c), Protease (d) e Amiloglicosidase (e), em relação ao tempo, para $ART_{inicial}=20$ g/L (Ensaio A) e $ART_{inicial}=30$ g/L (Ensaio B).

4 Conclusões

O *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se mostrou eficiente na produção simultânea de AMG e PTS, tendo como fonte de carbono o pré-hidrolisado de amido de milho comercial.

Foram correlacionados, além das atividades enzimáticas, os índices de ART, AR, pH, X e de bioconversão de ambos os ensaios. A partir disto observou-se que a concentração inicial de substrato a 30 g/L (Ensaio B) apresentou um panorama mais adequado à síntese simultânea da Amiloglicosidase e da Protease, ou seja, o aumento da concentração inicial de substrato colaborou para a produção das enzimas. Sugere-se para novos estudos um controle do pH, para que se mantenha na faixa ótima de atuação da AMG, afim de se induzir o consumo total de ART.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências

BLIEVA R., AKHMETSADYKOV N., ZHAKIPBEKOVA A., KALIEVA A. and RAKHMETOVA Z. Optimization of culture media for protease production by *Aspergillus fungi*. Asian J. Agric. Biol. 7(2):210-213, 2019

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. Journal of Biological Chemistry, n. 171, p. 6, 1947.

CLIMACO, L. R. Síntese de proteases ácidas por cultivo descontínuo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em hidrolisado de amido de milho. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá, 2019.

CORRADINI, E.; TEIXEIRA, E. de M.; AGNELLI, J. A. M.; MATTOSO, L. H. C. Amido Termoplástico. Embrapa. p. 27, São Carlos, SP. 2007

COSTA, F. A. T. da; BARDI, M. A. G.. Avaliação da biodegradação da blenda poli(butileno adipato co-tereftalato)/amido termoplástico em diferentes condições de solo simulado. **Ensaios Usf**, São Paulo, v. 2, n. 1, p.53-65, fev. 2018. Semestral. Disponível em: <<http://ensaios.usf.edu.br/ensaios/article/view/110/60>>. Acesso em: 09 ago. 2019.

CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. Enzyme and Microbial Technology, n.23, p.157–167, 1998.

DE CASTRO, R. J. S; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; et al. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, n. 4, p. 678–684, 2015.

FACCIOTTI, M. C. R. Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa-estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo no processo descontínuo. [s.l.] Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1986.

FANI, M. (Ed.). AMIDO: FONTES, TIPOS E PROPRIEDADES. **Aditivos & Ingredientes**, São Paulo, v. 1, n. 98, p.34-43, maio 2013

FANI, M. (Ed.). Função e Aplicação das Enzimas na Indústria Alimentícia. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, v. 1, n. 105, p.39-50, fev. 2014.

GREENE, H. C.; FRED, E. B. Maintenance of Vigorous Mold Stock Cultures. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 26, n. 12, p. 1297–1299, 1934.

NEGI, S. *et al.*: Single-Stage Fermentation of Glucoamylase and Protease by *A. awamori*, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) 310–315 (2011)

NEGI, S., BANERJEE, R.: Amylase and Protease Production from *A. awamori*, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 257–261 (2006)

OLIVO, J. E. **Síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 sob diferentes condições de controle da concentração de oxigênio dissolvido.** 1998. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

RÖDER, C. **Produção de amiloglicosidase por cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em sistema descontínuo a partir do amido de milho pré-sacarificado.** 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá, 2019.

SILVA, R. R. da; COELHO, G. D. Fungos - Principais grupos e aplicações biotecnológicas. São Paulo, SP: (2006).

SOUZA, P. M. de, BITTENCOURT, M. L. de A., CAPRARA, C. C., FREITAS, M. de, ALMEIDA, R. P. C. DE SILVEIRA, D., FONSECA, Y. M., FERREIRA FILHO, E. X., PESSOA JUNIOR, A., Magalhães, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. 2015. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140359>

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.1. São Paulo, 2020. [Acesso em: 10 de março de 2022]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>