

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Combinação de estratégias de inoculação e adição de indutor visando ao aumento da produtividade de pectinases em cultivo submerso de *Aspergillus oryzae*

Lenara Meneghel, Marieleme Santos, Betina Miglioranza, Aline Pozza, Caroline Rossi,
Eloane Malvessi e Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: lmscatharina@ucs.br

RESUMO

*As pectinases, enzimas úteis na indústria de sucos, podem ser obtidas utilizando-se fungos filamentosos como *A. oryzae*, em presença da pectina, indutor enzimático que confere alta viscosidade ao meio de cultivo. Nesses cultivos, o crescimento celular e o tempo de processo são diretamente afetados pela forma de inoculação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de inóculo vegetativo em processo submerso com *A. oryzae* IPT-301 para a produção de pectinases, adicionando-se a pectina aos cultivos após a fase de intenso crescimento celular. A estratégia de adição do indutor ao cultivo foi baseada no consumo de substrato. Utilizando-se 2,5% (v/v) de inóculo vegetativo, obteve-se atividade enzimática 6,8 vezes superior ao controle. Com a redução do tempo de processo, a produtividade aumentou em cerca de oito vezes, indicando que a utilização de inóculo vegetativo, associada à adição tardia de pectina, tem efeito positivo sobre a produção de pectinases.*

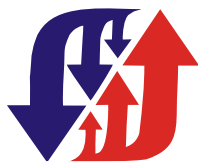
Palavras-chave: pectinases, *Aspergillus oryzae*, inóculo, indutor.

INTRODUÇÃO

As pectinases, enzimas úteis em processos de extração e clarificação de sucos, podem ser obtidas por bioprocessos em que se utilizam fungos filamentosos como *A. oryzae*, em presença da pectina, indutor enzimático. Verificou-se, em estudos anteriores (Meneghel et al., 2014), que a pectina confere alta viscosidade ao meio, dificultando a manutenção da homogeneidade do sistema e as transferências de calor e de massa, mas quando adicionada ao cultivo após a fase de intenso crescimento celular, facilita o controle de parâmetros de processo.

No entanto, o crescimento celular e o tempo de processo são diretamente afetados pela forma de inoculação, que pode ser realizada a partir de uma suspensão de esporos, conforme demonstrado por Malvessi & Silveira (2004) e Fontana et al. (2009), ou de um cultivo vegetativo (Reginato et al. 2014). Friederich et al. (1990) relataram que as atividades das enzimas pectinolíticas no meio de cultura estão diretamente relacionadas ao tamanho do inóculo e, ao utilizarem alta concentração inicial de *Aspergillus niger*, os autores constataram atividade significativa de pectina esterase já nas primeiras horas de cultivo.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar a inoculação com suspensão de esporos e inóculo vegetativo em cultivo submerso de *A. oryzae* para a produção de pectinases, adicionando-se o indutor enzimático aos cultivos após a fase de intenso crescimento celular.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi *A. oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo. O meio de cultivo empregado foi o descrito por Meneghel et al. (2014), composto de extrato de farelo de trigo (40 g/L), glicose (5,0 g/L), pectina (20 g/L, CPKelco), extrato de levedura (0,05 g/L) e sais. No Ensaio Controle, o meio foi inoculado com suspensão de esporos, de forma a obter-se concentração inicial de 10^5 esporos/mL de meio, enquanto nos Ensaios V2,5, V5 e V10, utilizou-se inóculo vegetativo, envolvendo o crescimento prévio do microrganismo em frascos sob agitação. Os frascos, por sua vez, foram inoculados a partir de suspensão de esporos e incubados a 30°C por 15 horas, até que o cultivo atingisse a fase exponencial. O biorreator foi, então, inoculado com proporções de 2,5, 5,0 e 10% (v/v) (V2,5, V5 e V10, respectivamente) desta cultura.

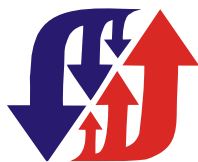
Os ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick), com 4,0 L de meio, a 28°C, por 120 h. O pH inicial do meio foi corrigido e mantido em 4,0 até o momento da adição do indutor, sendo então reduzido para 2,7 pela adição de ácido sulfúrico e controlado neste valor até o final do cultivo com NaOH 2,5 M e H₂SO₄ 1,5 M. O biorreator foi programado para manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação pela variação automática da frequência dos agitadores (300 a 750 rpm) e/ou fluxo de ar (0,125 a 1,25 vvm). As frações molares de oxigênio e dióxido de carbono foram determinadas em analisador de gases (EX-2000, New Brunswick).

As concentrações celulares foram estimadas a partir de dados da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) até que a fase exponencial fosse atingida; a partir de então passaram a ser avaliadas por gravimetria, após a separação da biomassa por filtração em papel filtro Whatman n° 1. A OUR, por sua vez, foi quantificada a partir do método do balanço gasoso, conforme descrito por Wang (1985). Os açúcares redutores totais foram determinados conforme método descrito por Bitmann (1974) e adaptado por Meneghel et al. (2014) para amostras isentas de sólidos em suspensão. A atividade de pectinases foi estimada a partir da redução de viscosidade de uma solução padrão de pectina (Maiorano, 1990).

O fator de produção específica ($Y_{P/X}$) foi calculado a partir dos máximos valores de atividade enzimática (P_{max}) e concentração de biomassa (X_{max}) obtidos no cultivo. Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$) foram calculados a partir dos máximos valores de atividade enzimática (P_{max}) e concentração de biomassa (X_{max}) e da concentração de substrato consumido até o tempo em que ocorreram os respectivos picos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A estratégia de adição do indutor ao cultivo, avaliada neste estudo, foi baseada no consumo de substrato. Utilizou-se a concentração de açúcares redutores (AR) como parâmetro, uma vez que, conforme demonstrado por Meneghel et al. (2014), neste tipo de processo, quando a pectina é adicionada ao meio após a fase de intenso crescimento celular e, conseqüentemente, intenso consumo de substrato, o controle dos parâmetros de processo é facilitado e altos títulos enzimáticos são obtidos. No entanto, se o substrato for esgotado, pode haver comprometimento da viabilidade celular. Assim, optou-se por incorporar o indutor enzimático ao meio de cultivo quando a concentração de AR atingisse valores próximos a 1,5 g/L. Considerando que a forma de inoculação altera os perfis cinéticos de crescimento celular e consumo de substrato, dependendo do inóculo utilizado, o tempo para que esta concentração fosse atingida variou: no Ensaio Controle, ocorreu em 24 h; em V2,5, em 18,5 h; em V5, em 17 h; em V10, em 13 h.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na Figura 1 (A), são mostrados os perfis de concentração de AR até 43 h de processo. Observa-se uma tendência de aumento dos valores de AR, seguido de queda, após a adição de pectina, em todos os ensaios. Esse comportamento pode estar relacionado com a ação das pectinases formadas (Figura 1 B), que estariam hidrolisando a pectina presente no meio de cultivo e liberando espécies redutoras, que foram posteriormente consumidas, conforme é indicado pelo perfil de queda nas concentrações de açúcares redutores.

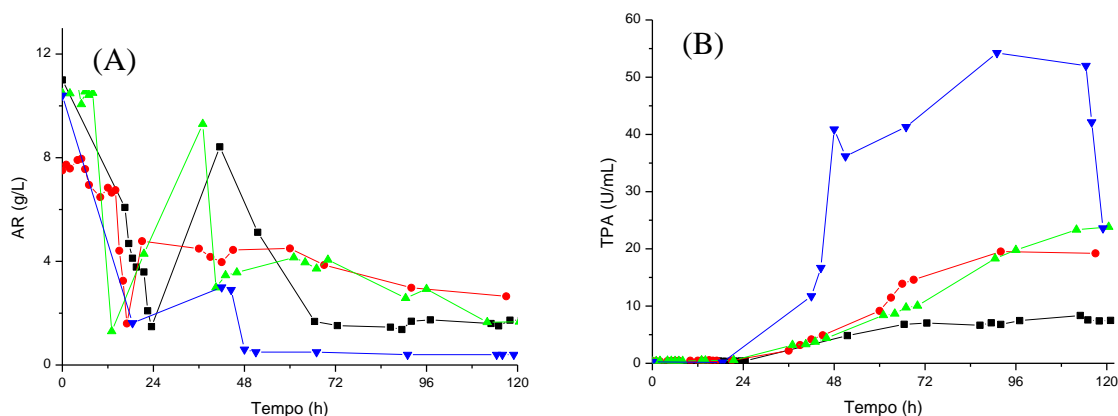
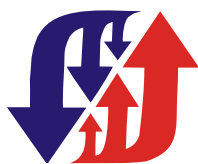


Figura 1: Perfis de concentração de açúcares redutores (A) e de atividade enzimática (B) de cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com diferentes formas de inoculação: (■) Controle, (▼) V2,5, (●) V5 e (▲) V10.

Os resultados gerais dos Ensaios Controle, V2,5, V5 e V10 são mostrados na Tabela 1. Observa-se que a forma de inoculação utilizada não afetou o máximo crescimento celular obtido. Possivelmente, a adição tardia do indutor ao cultivo facilitou as condições de transferência de oxigênio, evitando a limitação característica deste processo durante a fase de intenso crescimento celular, devido à presença da pectina. No entanto, maiores valores de atividade enzimática (P_{max}), produção específica ($Y_{P/X}$) e produtividade (p_v) foram obtidos nos cultivos em que inóculo vegetativo foi utilizado. Papagianni & Moo-Young (2002) verificaram que o tamanho do inóculo modifica a morfologia das células de *A. niger* quando cultivadas em meio líquido. Os autores avaliaram que quanto menor for a concentração inicial de inóculo no meio, maior será o diâmetro médio dos *pellets* formados, e, com essa morfologia, menores concentrações de produto são obtidas, já que a difusividade é dificultada. No entanto, em V2,5, apesar de o tempo para que a máxima atividade enzimática fosse obtida ter sido semelhante a V5, P_{max} foi 2,8 vezes superior, chegando a ser cerca de 6,5 vezes maior que no Ensaio Controle. A alta atividade enzimática obtida em V2,5 levou aos maiores valores de $Y_{P/X}$ e p_v entre as condições testadas.

Verificou-se que o maior valor de $Y_{X/S}$ entre as condições avaliadas foi obtido em V5, ainda que neste ensaio a concentração de substrato residual tenha sido maior. Este comportamento pode ser um indicativo de que o inóculo, além de afetar o perfil de consumo de substrato (Figura 1 A), modifica o rendimento de conversão em termos de crescimento celular.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1. Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com 2,5%, 5,0% e 10% de inóculo vegetativo (V2,5, V5 e V10) em comparação com o controle (10^5 esporos/mL).

| | Ensaio Controle | Ensaio V2,5 | Ensaio V5 | Ensaio V10 |
|--------------------------|-----------------|-------------|-----------|------------|
| X_{\max} (g/L) | 10,5 | 10,0 | 11,9 | 10,6 |
| $t_{X,\max}$ (h) | 66,5 | 44,5 | 66 | 13 |
| P_{\max} (U/mL) | 8,4 | 54,3 | 19,5 | 23,3 |
| $t_{P,\max}$ (h) | 113 | 91 | 92 | 112 |
| $Y_{P/X}$ (U/mg) | 0,80 | 5,43 | 1,64 | 2,20 |
| $Y_{P/S}$ (U/mg) | 0,90 | 5,43 | 3,54 | 2,03 |
| $Y_{X/S}$ (g/g/L) | 1,13 | 1,00 | 1,70 | 0,92 |
| S_{final} (g/L) | 1,70 | 0,4 | 2,6 | 1,7 |
| p_v (U/mL/h) | 0,074 | 0,597 | 0,211 | 0,205 |

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; S_{final} – concentração de ART ao final do processo; p_v – produtividade volumétrica.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a utilização de inóculo vegetativo tem efeito positivo sobre a produção de pectinases, levando à obtenção de maiores valores de atividade enzimática, à redução do tempo de processo e conseqüentemente, ao aumento da produtividade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, à FAPERGS, ao CNPq e à CAPES pelo apoio estrutural, financeiro e pela concessão de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bittman R. 1974. Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. *J Chem Education* 51: 49.
- Fontana RC, Polidoro TA, Silveira MM. 2009. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* 100: 4493-4498.
- Friederich J, Cimerman A, Steiner W. 1990. Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: Effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II trihydrate. *App Microbiol Biotechnol* 33: 377-381.
- Maiorano AE. 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- Malvessi E, Silveira MM. 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz Arch Biol Techn.* 47: 693-702.
- Meneghel L, Reis GP, Reginatto C, Malvessi E, Silveira MM. 2014. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochem.* 49: 1800-1807.
- Papagianni M, Moo-Young M. 2002. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process. Biochem.* 37: 1271-1278.
- Reginatto C, Noronha FP, Rossi C, Carra S, Meneghel L, Silveira MM, Malvessi E. 2014. Efeito do inóculo na obtenção de pectinases por *Aspergillus fumigatus*. *Anais do XX COBEQ*.
- Wang HY. 1985. Analysis of Fermentation Gases. In: MOO-YOUNG, M. *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press. pp. 423-431.