

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Efeito da fonte de carbono sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio líquido

Caroline Rossi, Aline Pozza, Lenara Meneghel, Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia  
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: crossi5@ucs.br

#### RESUMO

*O meio de cultivo afeta o crescimento celular e a produção de pectinases por fungos filamentosos, sendo que a fonte de carbono utilizada pode reprimir a produção enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de sacarose, glicerol e sorbitol, em cultivos de *Aspergillus oryzae* IPT-301, sobre consumo de substrato e produção de pectinases. Os cultivos foram realizados em frascos sob agitação com dois meios diferentes. Utilizando meio MS (semi-sintético), para avaliar o consumo, observou-se uma preferência pela glicose, mas com sorbitol obteve-se o maior rendimento em biomassa. Com meio WBEr, contendo extrato de farelo de trigo, onde se avaliou a produção de pectinases, a produção específica com glicose foi cerca de 20% inferior às determinadas com outras fontes de carbono, indicando uma possível repressão catabólica. Os resultados indicam a possibilidade de utilização de glicerol, sacarose e sorbitol como fontes de carbono para a produção de pectinases.*

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, pectinases, meio de cultivo, fonte de carbono.

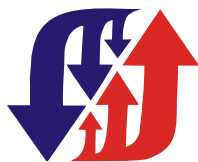
#### INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas são capazes de degradar substâncias pécicas que conferem alta viscosidade e turbidez a sucos de frutas e vinhos, facilitando as etapas de filtração e concentração e aumentando o rendimento global do processo. Estas enzimas podem ser obtidas com microrganismos, sendo que quase todas as preparações comerciais são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Jayani *et al.* 2005).

A composição do meio de cultivo influencia tanto o crescimento celular quanto a produção de pectinases, uma vez que pode conter substâncias que afetam os fenômenos de indução, repressão catabólica e inibição de produção (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997).

Rombouts e Pilnik (1980) relatam que meios de cultivo elaborados com concentrações balanceadas de pectina e carboidratos simples levam a melhores resultados na produção de enzimas pécicas em processo submerso. A glicose é o monossacarídeo mais abundante da natureza e, segundo Madigan (2010), a fonte preferencial de carbono para obtenção de energia por fungos filamentosos; no entanto, a glicose pode provocar repressão catabólica da produção de enzimas, dificultando a assimilação dos substratos disponíveis e a produção enzimática. Ainda, Teixeira *et al.* (2000) verificaram que a atividade pectinolítica é diretamente afetada pela fonte de carbono utilizada no meio de produção e altas quantidades de glicose, sacarose e glicerol têm efeito de repressão sobre a formação de pectinases.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de sacarose, glicerol e sorbitol, em substituição à glicose, em meio de cultivo de *A. oryzae* IPT-301, em termos de consumo de substrato e produção de pectinases.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi *A. oryzae* IPT-301. O meio MS (Malvessi, 2000), foi utilizado para avaliação do consumo das fontes de carbono e continha: fonte de carbono (22,0 g/L), peptona (13,0 g/L), extrato de levedura (0,5 g/L), sulfato de amônio (10,0 g/L) e outros sais. Para avaliar a produção de pectinases, utilizou-se o meio WBER (Meneghel *et al.*, 2014), contendo: fonte de carbono (5,0 g/L), extrato de farelo trigo (40,0 g/L), extrato de levedura (0,05 g/L), sulfato de amônio (5,0 g/L), outros sais e pectina cítrica (CPKelco, 20g/L).

Foram realizados quatro ensaios com cada meio de cultivo, cada um com uma das fontes de carbono, identificados como: com glicose, WBER1 e MS-1; com sacarose, WBER2 e MS-2; com glicerol, WBER3 e MS-3; com sorbitol WBER4 e MS-4.

Todos os cultivos foram realizados em agitador recíproco (B. Braun Biotech, modelo Certomat, RFA) utilizando frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio, a 300 rpm, 28°C e pH inicial 4,0, inoculados com  $10^5$  esporos/mL. Os experimentos com meio MS foram conduzidos por 33 h e os com meio WBER por 144 h de processo.

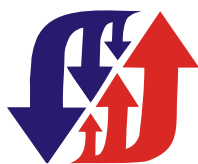
A concentração celular foi quantificada por gravimetria e a atividade total de pectinases (TPA) pela redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina (Malvessi, 2000). As fontes de carbono foram determinadas por métodos colorimétricos. A glicose por DNS (Miller, 1959), sacarose conforme descrito por Falcone e Marques (1965), glicerol pelo método de Girardi (2014) e sorbitol conforme definido por Carra (2012).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

No meio WBER há presença de extrato de farelo de trigo, que é composto principalmente por amido. Assim, após algumas horas de processo, as amilases produzidas pelo fungo hidrolisam o amido em moléculas menores, de fácil assimilação, causando interferência na avaliação do consumo das fontes de carbono em teste. Sendo assim, foram realizados, inicialmente, ensaios em meio solúvel semissintético (MS), em que o consumo dos substratos em estudo (glicose, glicerol, sacarose ou sorbitol) pudesse ser mais bem observado.

Na Figura 1 (A), estão mostrados os perfis de consumo da fonte de carbono em meio MS. Observa-se que, conforme esperado, a glicose foi o substrato consumido em maior quantidade (21,7 g/L), seguido por sacarose (18,7 g/L), sorbitol (15,2 g/L) e glicerol (14,7 g/L). Estes resultados indicam que o glicerol é a fonte de carbono mais difícil de ser assimilada pelo microrganismo em estudo. Vale ressaltar que as concentrações de glicerol em 15 e 16 h de cultivo resultaram em valores superiores aos iniciais, possivelmente devido ao método ser pouco sensível para altas concentrações. No entanto, considera-se que, neste caso, até cerca de 18 h de processo, não houve consumo do referido substrato. Na Figura 1 (B), são mostrados os perfis de pH em meio MS. Em MS-1, MS-2 e MS-4, observam-se perfis semelhantes de pH, com queda gradual até valores próximos a 2,5. Já no ensaio realizado com glicerol (MS-3), o valor de pH, após 33 h de processo, ficou em torno de 3,5, sendo também o que apresentou menor consumo da fonte de carbono disponível, indicando que há uma relação entre o consumo de substrato e o pH do meio, conforme já relatado por Meneghel *et al.* (2014).

Na Tabela 1, são mostrados os resultados dos ensaios realizados com meio MS, para análise de consumo do substrato. Verificou-se que as maiores concentrações celulares foram atingidas nos ensaios MS-1 e MS-2, cerca de 10 g/L, após 33 h de processo, sendo possível supor que, caso o tempo de cultivo fosse estendido, maiores concentrações de biomassa



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

poderiam vir a ser obtidas. Pôde-se verificar que utilizando este meio solúvel, nenhuma das fontes de carbono testadas inibiu o crescimento celular, nas condições de realização dos experimentos e nas concentrações em que foram utilizadas.

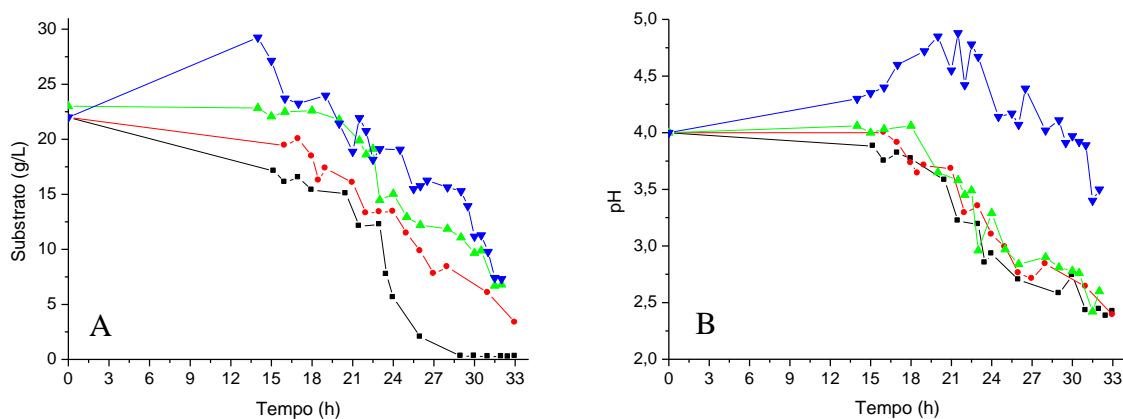


Figura 1: Perfis de consumo de substrato (A) e de pH (B), para os experimentos realizados com meio MS com diferentes fontes de carbono: (■) glicose, (●) sacarose, (▼) glicerol e (▲) sorbitol.

Tabela 1: Resultados gerais dos cultivos com meio MS.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$	$t_{x,m\acute{a}x}$	$Y_{X/S}$
MS-1	10,5	33	0,48
MS-2	10,4	33	0,56
MS-3	8,5	31,5	0,58
MS-4	9,3	30	0,61

$X_{m\acute{a}x}$ : máxima concentração de biomassa;  $t_{x,m\acute{a}x}$ : tempo em que foi obtido  $X_{m\acute{a}x}$ ;  $Y_{X/S}$ : fator de conversão de substrato em células. MS-1: glicose; MS-2: sacarose; MS-3: glicerol; MS-4: sorbitol.

Apesar de os ensaios MS-1 e MS-2 terem apresentado os maiores títulos de biomassa e maior consumo de substrato em 33 h, foi no experimento MS-4 que se obteve o maior  $Y_{X/S}$ , cerca de 27% superior ao obtido em MS-1. Este fato indica que, apesar de a sacarose ser o substrato mais rapidamente consumido, em seguida à glicose, o sorbitol foi o que apresentou o maior rendimento em relação ao crescimento celular entre as fontes de carbono testadas.

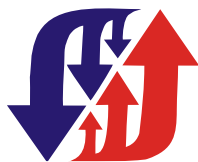
Os cultivos com meio WBER tiveram o objetivo de avaliar a produção enzimática. Na Tabela 2, são mostrados os resultados gerais para os ensaios realizados com este meio.

Tabela 2: Resultados gerais dos ensaios realizados com meio WBER.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	$t_{P,m\acute{a}x}$	$pH_{t,P,m\acute{a}x}$	$Y_{P/X}$
WBER1	10,5	10,0	120	2,3	0,95
WBER2	9,7	11,7	120	2,3	1,21
WBER3	9,3	11,4	144	2,6	1,23
WBER4	9,8	11,3	144	2,4	1,16

$X_{m\acute{a}x}$ : máxima concentração de biomassa;  $P_{m\acute{a}x}$ : máxima atividade de pectinases;  $Y_{P/X}$ : fator de produção específica. WBER1: glicose; WBER2: sacarose; WBER3: glicerol; WBER4: sorbitol.

Com a pectina estava presente no meio de produção WBER, o crescimento microbiano foi pouco afetado, atingindo-se valores em torno de 10,0 g/L com todas as fontes de carbono testadas. Já a produção enzimática se mostrou superior com as três fontes de carbono de assimilação mais lenta, chegando a ser 10% superior em relação ao meio com glicose.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O valor de  $Y_{P/X}$  obtido no ensaio WBER1 foi cerca de 20% inferior ao restante dos ensaios, o que pode ser um indicativo de que a glicose exerce, de fato, efeito repressor sobre a produção de enzimas pectinolíticas, na concentração em que é utilizada no meio WBER. Este fato é também descrito por Teixeira *et al.* (2000), que observou que *A. japonicus* foi suscetível à repressão catabólica quando utilizado 0,5% (m/v) de glicose no meio de cultivo.

Meneghel *et al.* (2014) e Martínez-Trujillo *et al.* (2009) relataram que a produção de pectinases tem relação intrínseca com o pH do meio. Para Meneghel *et al.* (2014), o pH ideal de produção destas enzimas é de 2,7. Observa-se, ainda na Tabela 2, que os valores de pH no tempo em que foi obtida a máxima atividade enzimática estavam abaixo de 2,7. Assim, em condições de processo em que fosse possível o controle deste parâmetro, como, por exemplo, em experimentos realizados em biorreator, maiores títulos enzimáticos poderiam ser obtidos.

### CONCLUSÕES

Os resultados, ainda que preliminares, indicam a possibilidade de utilização de glicerol, sacarose e sorbitol como fontes de carbono alternativas à glicose em cultivo de *A. oryzae* IPT-301 para a produção de pectinases. Além disso, a utilização de glicerol ou sacarose poderia reduzir o custo do processo de produção, por se tratarem de substratos de menor valor comercial que a glicose.

### AGRADECIMENTOS

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

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carra S. 2012. Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Falcone M, Marques AB. 1965. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). *Tecnol de Alim e Bebidas* 4: 24-30.
- Galiotou-Panayotou M, Kapantai M, Kalantzi O. 1997. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *App Microbiol and Biotechnol* 47: 425-429.
- Girardi V. 2014. Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa de 2,3-butanodiol por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Dissertação de mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proces Biochem* 40: 2931-2944.
- Madigan MT. 2010. *Microbiologia de Brock*. 12.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Malvessi E. 2000. Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS, Gómez-Sánchez C, Aguilar BT, Aguilar-Osorio G. 2009. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Braz J Microbiol* 40: 40-47.
- 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. *Proc Biochem* 49: 1800-1807.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31: 426.
- Rombouts EM, Pilnik W. 1980. Pectic Enzymes. In: Rose. A. (Ed). *Economic Microbiology*, v. 5. London: Academic Press, p. 693.
- Teixeira MFS, Lima-Filho JL, Durán N. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz J Microbiol* 31: 286-290.