



EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE PELLETS FÚNGICOS

EFFECTS OF CULTIVATION CONDITIONS FOR OBTAINING FUNGAL PELLETS

Flaviane Borges TEIXEIRA¹ • Ester Vieira GONÇALVES² • Fernanda Melo CARNEIRO³ • Solange Xavier SANTOS⁴ • Samantha Salomão CARAMORI⁵

Resumo

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados na biotecnologia para a produção de diversos produtos. Os pellets são aglomerados esféricos de micélios densamente entrelaçados, que facilitam a separação da biomassa do meio de cultivo líquido. O estudo realizado teve como objetivo avaliar a formação de pellets do fungo *Aspergillus niger* em dois diferentes meios de cultivo, enriquecidos com diferentes fontes de nitrogênio e variação do pH. Os esporos fúngicos foram incubados nos dois meios de cultivo avaliados, nas faixas de pH 6, 7, 8 e 9 a 28 °C por 48 h em agitador orbital. A análise de sólidos suspensos totais (SST) foi realizada para avaliar o crescimento dos pellets e as médias foram comparadas através de Two-way ANOVA e teste de Tukey (<0,05). O meio Sabouraud apresentou diferença significativa no rendimento entre o pH 7 e o pH 9. O meio composto também apresentou diferenças de rendimento e morfologia dos pellets de acordo com o pH utilizado. O estudo concluiu que o tipo de meio de cultivo e o pH influenciam diretamente no crescimento dos pellets fúngicos. O meio Sabouraud obteve melhor desempenho, com resultados diferentes dependendo do pH utilizado. O pH próximo ao valor ótimo de 7 foi mais favorável para a produção de biomassa.

Palavras-chave: *Extrato de levedura, Fungos filamentosos, Morfogênese, Peptona, pH, Rendimento de biomassa*

Abstract

Filamentous fungi are widely used in biotechnology for the production various products. The pellets are densely intertwined spherical clusters of mycelia, which facilitate the separations of biomass from the liquid culture medium. The objective of this study was to evaluate the formation of pellets of the fungus *Aspergillus niger* in two different culture media, enriched with different sources of nitrogen and pH variation. Fungal spores were incubated in the two-culture media evaluated, at pH 6, 7, 8 and 9 at 28 °C for 48 h in an orbital shaker. Total suspended solids (TSS) analysis was performed to assess pellet growth and means were compared using Two-way ANOVA and Tukey's test (<0,05). The Sabouraud medium showed a significant difference in yield between pH 7 and pH 9. The composite medium also showed differences in yield and pellet morphology according to the pH used. The study concluded that the type of culture medium and pH directly influence the growth of fungal pellets. The Sabouraud medium performed better, with different results depending on the pH used. The pH close to the optimal value of 7 was more favorable for biomass production.

Keywords: *Yest extract, Fungi filamentous, Morphogenesis, Peptone, pH, Yield biomass.*

✉ Flaviane B. Teixeira, flavianeborges89@gmail.com

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás - UEG, Câmpus Central, Anápolis-GO. <https://orcid.org/0000-0002-9875-004x>

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado UEG, Câmpus Central, Anápolis-GO. <https://orcid.org/0000-0001-9272-2796>

³ Docente da UEG, Laboratório de Ficologia, Unidade Universitária de Goiânia - Laranjeiras, Goiânia - GO. <https://orcid.org/0000-0001-6389-4564>

⁴ Docente da UEG, Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica UEG - Câmpus Central, Anápolis-GO. <https://orcid.org/0000-0002-3397-0885>

⁵ Docente da UEG, Laboratório de Biotecnologia, Câmpus Central, Anápolis - GO. <https://orcid.org/0000-0003-2676-8280>

Manuscrito recebido: 30/06/2023

Aceito para publicação: 10/09/2023

Introdução

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos, produzindo produtos como antibióticos, enzimas e ácidos orgânicos (LIU; LIAO; CHEN, 2008). Em culturas submersas, os fungos filamentosos podem crescer de duas formas distintas a depender das condições de cultivo (VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018): em forma micelial, formando uma massa de filamentos tornando o meio mais viscoso, dificultando a utilização da biomassa; e em forma de pellets, que é uma massa esférica de micélios densamente entrelaçados,

cercados por uma camada de hifas, facilitando a recuperação da biomassa do meio líquido para a sua utilização (PAPAGIANNI, 2007; LIU; LIAO; CHEN, 2008; LI et al., 2019). A partir dos pellets do fungo *Aspergillus niger* obtém-se alguns produtos como o ácido cítrico, ácido glucônico e α -amilase (LI et al., 2022; WANG et al., 2016; PAPAGIANNI, 2007). Também tem sido utilizado no processo de biofloculação de microalgas, não sendo necessário o uso de floculantes químicos, o que torna o processo menos oneroso e mais sustentável (NASIR et al., 2019; PEI; REN; LIU, 2021).

O processo de formação de pellets pode ser explicado pelas propriedades físico-químicas da cepa utilizada. Temperaturas mais altas e rotação forte levam a obtenção mais rápida de pellets em menor diâmetro (LIU; LIAO; CHEN, 2008), aumentando a área de contato, o que geralmente é mais desejável (PAPAGIANNI, 2007). O pH influencia nesse processo devido às características hidrofóbicas e eletrostáticas da superfície das células, com efeito da repulsão ou atração dos esporos, favorecendo a formação de pellets (WARGENAU et al., 2011; LIU; WU, 2012). Essas propriedades da superfície das células são inerentes e controlam a morfologia micelial e a formação de pellets, sendo influenciadas pelo pH do meio de cultivo e afetando o crescimento da biomassa (LIU; WU, 2012).

O meio de cultivo é outro fator determinante na obtenção de pellets fúngicos. Como microrganismos heterotróficos, os fungos necessitam de compostos orgânicos e a principal fonte de carbono são geralmente açúcares (PAPAGIANNI, 2007). Assim como o pH, a composição do meio tem efeito na morfologia de micélios fúngicos, agindo no seu crescimento e na geração de produtos (LIU; WU, 2012; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Fontes de nitrogênio também são utilizadas em meios de cultivo e afetam a morfologia do fungo dependendo da quantidade utilizada, podendo gerar pellets maiores, mais ou menos densos, interferindo no rendimento da biomassa (FU et al., 2014; PAPAGIANNI, 2007).

Como são diversos os fatores que influenciam na formação de pellets (PAPAGIANNI, 2007; LIU; LIAO; CHEN, 2008), torna-se necessário investigar quais as condições ideais para obter melhores resultados, aumentando a produção da biomassa, e assim, apoiar estudos de biorremediação, biofloculação e obtenção de metabólitos secundários.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a formação de pellets em dois diferentes meios de cultivo, enriquecidos com diferentes fontes de nitrogênio e uma variação do pH em ambos os meios.

Material e Métodos

Obtenção e cultivo do fungo

O fungo *Aspergillus niger* foi obtido da coleção de culturas de fungos do Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica (FungiLab) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Câmpus Central Sede: Anápolis-GO. As placas de Petri (10 cm de diâmetro) e o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min, em seguida o meio de cultura foi vertido nas placas e mantidos a temperatura ambiente até a sua solidificação. Os esporos fúngicos da cultura de origem foram inoculados com o auxílio de alça bacteriológica em câmara de fluxo laminar (Filterflux) e incubados em demanda bioquímica de oxigênio (BOD Solab científica, modelo SL200) a 28 °C por 5 d para formação de esporos novos (GONÇALVES et al., 2023). Após o período de cultivo, as placas de Petri foram armazenadas a 4 °C para manutenção da cultura.

Preparo da suspensão de esporos

Para preparar a suspensão de esporos, foram utilizados tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo 10 mL de tampão fosfato 1 mol/L com pH 7 e 0,1 mL de Tween 80, esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C (LIU; WU, 2012). Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de alça bacteriológica, os esporos foram transferidos da placa de Petri para os tubos de ensaio e agitados por 3 min com velocidade média em vórtex (Phoenix Lufenco, AP59). Uma alíquota da suspensão de esporos foi utilizada para contagem dos esporos em câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400 vezes (ALVES; FARIA, 2010). A concentração da solução de esporos utilizada foi de $28,5 \times 10^5$ mL⁻¹.

Meios de Cultivo

Foram empregados dois diferentes meios de cultivo com objetivo de avaliar o processo de

formação de pellets. O primeiro meio consistiu em uma solução contendo 15 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de sacarose. O segundo meio utilizado foi o meio Sabouraud, composto por 10 g/L de peptona e 40 g/L de glicose. Ambos os meios foram submetidos à esterilização em autoclave a uma temperatura de 121 °C por 15 min.

Formação de Pellets

Um experimento foi conduzido com para investigar a formação de pellets nos dois tipos de meio, bem como a influência do valor de pH inicial. Os valores de pH escolhidos para análise foram 6, 7, 8 e 9. O ajuste do pH foi realizado através da adição de HCl 1mol/L e NaOH 1 mol/L, com o auxílio de um pHmetro de bancada (modelo PHS-3E da marca pHTEK).

O processo de obtenção dos pellets foi realizado por meio da fermentação submersa (GONÇALVES et al., 2023). Para isso foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 50 mL do respectivo meio de cultivo. Cada meio foi inoculado com 1 mL da suspensão de esporos. Os frascos foram colocados em incubadora com agitação orbital com velocidade de 150 rpm (Novatecnica, modelo NT 715), mantidos a uma temperatura constante de 28 °C durante um período de 48 horas.

Após a conclusão do período de incubação, os pellets formados foram separados do líquido por meio de filtração utilizando papel Whatman número 1, juntamente com um Kitassato e uma bomba de vácuo. Em seguida, o crescimento dos pellets foi avaliado através da análise de Sólidos Suspensos Totais (SST).

Análise de Sólidos Suspensos Totais

A análise de Sólidos Suspensos Totais (SST) foi realizada em triplicata, seguindo metodologia padrão (APHA, 2005). Foi obtida a massa inicial (P0) do conjunto cadinho e filtro. Alíquotas de um volume (V) das amostras filtradas e o material retido no filtro foi lavado com água destilada. Os cadinhos com os filtros utilizados foram levados à estufa de secagem (Fanem, Estufa 515) a 105 °C para evaporação da água e, após resfriamento em dessecador, foi obtida a massa do conjunto (P1). A concentração de sólidos suspensos totais (em g/L) foi calculada a partir da equação:

$$SST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P1 - P0)}{V}$$

Onde: P0 = massa inicial do conjunto cadinho + filtro, em gramas;
P1 = massa após evaporação da água do conjunto cadinho + filtro + amostra, em gramas;
V = volume da alíquota, em litros.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. Primeiramente, a normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste foi aplicado a cada grupo experimental (diferentes níveis de pH e meios de cultivo) para verificar se os dados seguem uma distribuição normal. O segundo pressuposto para avaliar a homogeneidade de variâncias, foi o teste de Brown-Forsythe. Esse teste foi empregado para verificar se as variâncias dos diferentes grupos experimentais são estatisticamente iguais. Após confirmar a distribuição normal e a homogeneidade de variâncias, a Two-way ANOVA e teste de Tukey (p<0,05) foram conduzidos para avaliar as diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Resultados

Em meio Sabouraud houve a formação de pellets com morfologia e diâmetro uniformes, apresentando a influência do pH na quantidade de pellets. Como pode-se observar na Figura 1, houve uma maior formação de pellets nos valores de pH 6 e 7, seguido de uma diminuição nos valores de pH 8 e 9, mostrando a influência desta variável no processo de obtenção dos pellets.

No meio de cultivo formado pelo extrato de levedura e sacarose, houve a formação de pellets com morfologia variada, obtendo-se o crescimento em esferas com diferentes diâmetros e na forma alongada, o que diminui a superfície de contato. Nos diferentes pHs o fungo apresentou um crescimento variado. A sua morfologia foi influenciada tanto pelo meio, quanto pelo pH.

O meio Sabouraud apresentou diferença significativa entre o pH 7 e o pH 9 (<0,05) para a formação dos pellets, mas não indicou haver diferença entre o rendimento nos pHs 6, 7 e 8. Este resultado também foi encontrado no meio de cultivo composto pelo extrato de levedura e sacarose, porém quando comparado a eficiência entre os dois meios, houve melhor rendimento do pH 7 do

meio Sabouraud sobre todos os pHs variados no meio de cultura formado pelo extrato de levedura e sacarose. O pH teve efeito quanto a morfologia dos fungos no meio de cultivo de extrato de levedura e sacarose, obtendo esferas maiores no pH 8. O pH e o tipo de meio de cultivo tiveram influência sobre o rendimento dos pellets.

meio Sabouraud sobre todos os pHs variados no meio de cultura formado pelo extrato de levedura e sacarose. O pH teve efeito quanto a morfologia dos fungos no meio de cultivo de extrato de levedura e sacarose, obtendo esferas maiores no pH 8. O pH e o tipo de meio de cultivo tiveram influência sobre o rendimento dos pellets.

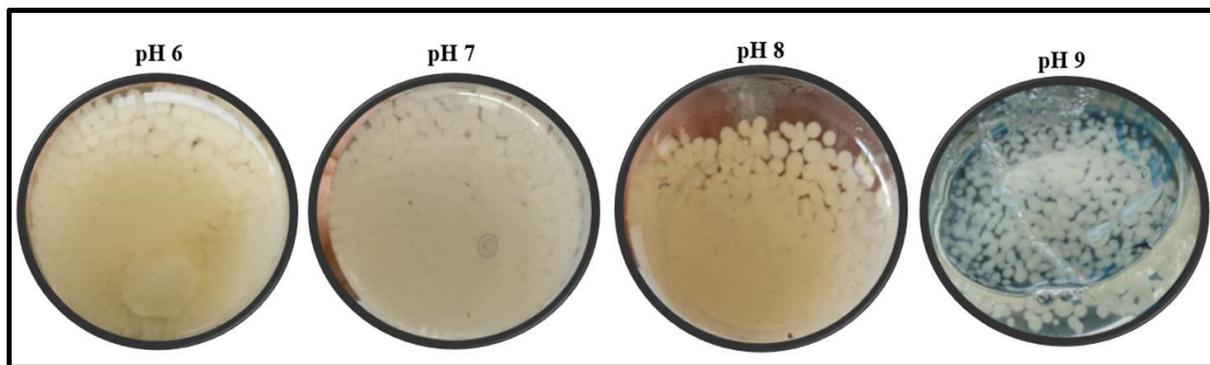
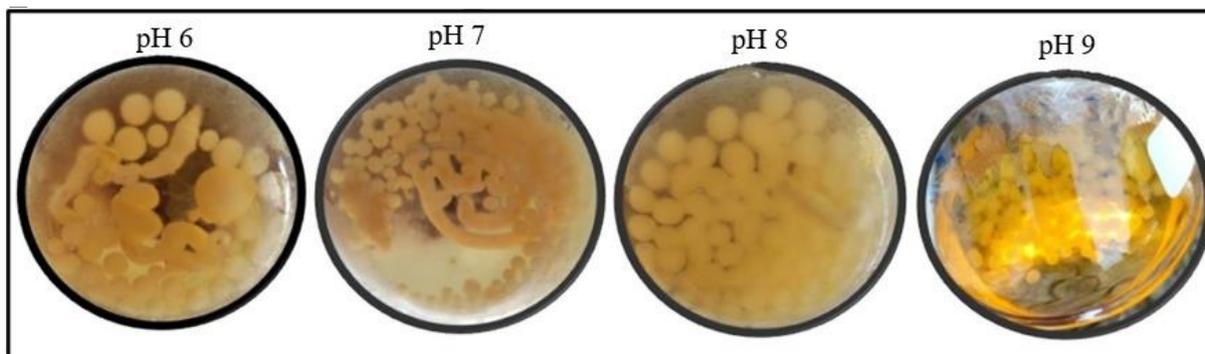


Figura 1. Formação de pellets em meio Sabouraud e em diferentes condições de pH.



Formação de pellets em meio de cultivo (extrato de levedura e sacarose) e em diferentes condições de pH.

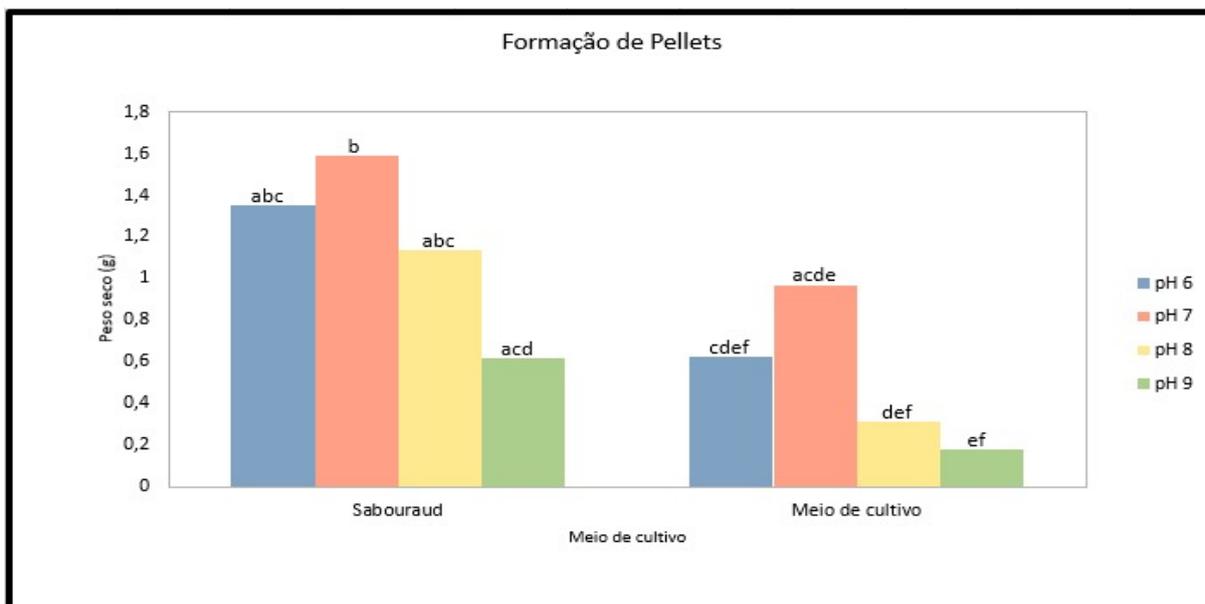


Figura 3. Rendimento em peso seco (g) de pellets fúngicos em diferentes meios de cultivo e pH. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística no grupo e entre grupos ($p < 0,05$).

Discussão

A formação de pellets em culturas fúngicas submersas é um processo complexo influenciado por diversos fatores, como a composição do meio de cultivo e as condições de pH. Esta pesquisa investigou a formação de pellets do fungo *Aspergillus niger* em diferentes meios de cultivo e sob variações de pH, avaliando a influência do nitrogênio e do pH, assim como a interação entre esses dois fatores.

A presença de diferentes fontes de nitrogênio nos meios de cultivo, como a peptona e o extrato de levedura, teve um impacto direto na formação dos pellets. Dados semelhantes a essa pesquisa foram descritos por Fu et al. (2014), que analisou a influência da concentração de peptona como fonte de nitrogênio na morfologia de pellets. Os resultados indicaram que concentrações mais altas de peptona influenciou positivamente a formação de pellets, obtendo esferas mais homogêneas e densas. Estes resultados também foram encontrados por Liao et al. (2007), que encontraram um efeito positivo com a utilização da peptona para a formação de pellets.

Esses estudos sugerem que a disponibilidade de nitrogênio influencia na interação entre as células fúngicas, afetando a sua agregação e tem um impacto significativo na qualidade da morfologia dos pellets formados (FU et al., 2014; PASCUAL et al., 2000). O nitrogênio é essencial para o crescimento microbiano, a sua disponibilidade está relacionada com a síntese de proteínas, nucleotídeos e outros compostos essenciais para o crescimento celular, o que pode explicar os dados encontrados nessa pesquisa.

Em relação ao pH, as propriedades superficiais das células fúngicas desempenham um fator importante na formação dos pellets. A hidrofobicidade e características eletrostáticas da superfície celular são afetadas pelo pH do meio de cultivo, afetando a interação entre as células e, portanto, podem afetar a sua adesão e capacidade de agregação (WARGENAU et al., 2011). Dessa forma a obtenção de pellets fúngicos depende diretamente do pH, por causa da superfície dos fungos, pois ele age diretamente nela, direcionando a sua formação (LIU; LIAO; CHEN, 2008, PAPAGIANNI, 2007).

Em estudos conduzidos por Liao et al. (2007) e Liu e Wu (2012), a variação do pH influenciou na formação dos pellets, com um pH ótimo de 6, sendo necessário manter uma faixa

próxima do pH ótimo, pois se estiver muito abaixo ou mais alto que o ideal, afeta o crescimento dos fungos e diminui o rendimento da formação de pellets. Esses resultados explicam o efeito do pH neste estudo, pois nas faixas próximas ao pH ótimo 7 não houve diferença significativa, porém quando comparado a uma faixa mais distante, que foi o pH 9, este apresentou um menor rendimento ($p < 0,05$). A morfologia dos pellets também foi distinta de acordo com a faixa de pH utilizada no meio, um resultado semelhante ao encontrado por Nasir et al. (2019), que obteve a formação de pellets com maior diâmetro em pH 8.

O experimento conduzido demonstrou que a variação do pH nos meios de cultivo levou a diferenças na quantidade e morfologia dos pellets. No entanto, o efeito do pH variou dependendo do meio de cultivo. Enquanto o meio Sabouraud apresentou melhor rendimento na obtenção dos pellets, o meio de cultivo composto pelo extrato de levedura e sacarose apresentou uma variação da morfologia dos pellets em diferentes pHs. Dessa forma, tanto o meio de cultivo quanto o pH utilizado interferem diretamente na formação do pellet, o pH age sobre a termodinâmica da superfície dos esporos, que também sofre interferência das propriedades do meio de cultivo, alterando o seu rendimento e morfologia (LIU, LIAO & CHEN, 2008).

Portanto, esta pesquisa forneceu a compreensão sobre a influência do nitrogênio e do pH na formação de pellets fúngicos. Ao analisar as diferentes fontes de nitrogênio e variação do pH em meios de cultivos específicos, foi possível destacar a complexidade das interações entre esses dois fatores e sua influência na morfologia e crescimento dos pellets. Esses resultados são importantes para otimizar o processo de cultivo de fungos filamentosos, visando a produção de biomassa e a aplicação em processos biotecnológicos.

Conclusões

Os efeitos do nitrogênio e do pH na formação de pellets do fungo *A. niger* foram investigados, destacando que existe uma interdependência entre esses fatores e a morfologia dos pellets. A análise de diferentes fontes de nitrogênio mostrou que a peptona apresentou rendimento significativo na obtenção dos pellets. A influência do pH na formação de pellets ressalta a importância das

propriedades de superfície das células, pois a tendência de agregação depende de carga elétrica. Portanto, a interação entre nitrogênio e pH requer consideração na otimização do cultivo de fungos filamentosos. Pesquisas adicionais são necessárias para entender melhor sobre as vias metabólicas influenciadas pelo nitrogênio e pH, a fim de compreender como esses fatores afetam a formação de pellets em nível molecular. De forma geral, essa pesquisa amplia nossa compreensão da formação de pellets fúngicos e as implicações práticas que podem ser exploradas em diversas aplicações biotecnológicas, reforçando a importância da otimização dos processos de cultivo fúngico para obtenção da biomassa.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa concedida e a Universidade Estadual de Goiás – Plataforma Institucional de Pesquisa e Inovação de Bioinsumos.

Referências

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina (DF), **Embrapa Cerrados**, p. 26-31, 2010.

APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21. ed. Washington: 2005.

FU, YQ. et al. Effects of Pellet Characteristics on L-Lactic Acid Fermentation by *R. oryzae*: Pellet Morphology, Diameter, Density, and Interior Structure. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 2019–2030, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1146-1>

GONÇALVES, E. V. et al. Immobilized fungi in commercial polyurethane foam removes short-time phosphorus from domestic effluents. **Environmental Challenges**, v. 11, p. 100693, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100693>.

LI, L. et al. A review on mycelial pellets as biological carriers: Wastewater treatment and recovery for resource and energy, **Bioresource Technology**, v. 355, p. 127200, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127200>.

LI, S. et al. In vivo and in vitro efficient textile wastewater remediation by *Aspergillus niger* biosorbent. **Nanoscale Advances**, v. 1, n.1, p. 168-176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8NA00132D>

LIAO, W. et al. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*, **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, 2007, p. 3415-3423, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.028>.

LIU, Y.; LIAO, W.; CHEN, S. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 99, p. 117-128, 2008. Disponível em: <https://doi.org.ez163.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bit.21531>

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 623–628, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1066-9>

NASIR, N. M. et al. Subtopic: Advances in water and wastewater treatment harvesting of *Chlorella* sp. microalgae using *Aspergillus niger* as bio-flocculant for aquaculture wastewater treatment, **Journal of Environmental Management**, V. 249, p. 109373, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109373>.

PAPAGIANNI, M., Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>.

PASCUAL S. et al. (2000) Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. **J Appl Microbiol**, v. 89, n. 5, p. 847–853, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01189.x>

PEI, X. Y.; REN, H. Y.; LIU, B. F. Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on

harvesting of microalgal biomass, **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124463, 2021.

Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124463>.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, P. 2997–3006, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>

WANG, B. et al. Pellet-dispersion strategy to simplify the seed cultivation of *Aspergillus niger* and optimize citric acid production. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 40, p. 45–53, 2017. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s00449-016-1673-y>

WARGENAU A. et al. On the origin of the electrostatic surface potential of *Aspergillus niger* spores in acidic environments. **Res Microbiol**, v. 162, n. 10, p. 1011–1017, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.07.006>