



INFLUÊNCIA DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS NA MORFOLOGIA DE *Aspergillus niger* E NA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE

A.L.Z. FERREIRA¹; M. M. BUFFO²; C. S. FARINAS³; A.C. BADINO⁴

¹Aluno de graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. andreluis_zozzi@hotmail.com;

²Aluna de doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP; marianembuffo@gmail.com

³Pesquisadora da Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. cristiane.farinas@embrapa.br

⁴Professor do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. badinojr@ufscar.br

RESUMO – Atualmente existe uma grande preocupação econômica e ambiental com relação às fontes de energia utilizadas. Antevendo a escassez e/ou a limitação do uso de combustíveis fósseis por questões ambientais, faz-se necessária uma busca por fontes de energia alternativas renováveis e sustentáveis como o bioetanol de segunda geração. Um dos gargalos do processo de bioetanol é o alto custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise da biomassa. Portanto, a produção dessas enzimas (celulases e hemicelulases) a baixo custo é ainda um desafio no desenvolvimento de um processo sustentável para a produção de etanol 2G. No presente trabalho são apresentados os resultados referentes à influência do pH e a concentração inicial de esporos (C_e) na morfologia do fungo filamentoso *Aspergillus niger* e conseqüentemente na produção de endoglucanase. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL em duas etapas: a primeira de crescimento do inóculo fixado em 48 h e a segunda etapa de produção de 72 h, utilizando lactose como indutor. Na etapa de inóculo realizaram-se ensaios referentes à condição experimental de um planejamento fatorial 2^2 , onde as variáveis independentes pH e C_e variaram, respectivamente, de 2,0 a 6,0 e de 5×10^3 a 5×10^7 na etapa de inóculo. Com isso foram obtidas diferentes morfologias, desde grandes *pellets* até a morfologia dispersa. O maior valor de atividade de endoglucanase obtida foi $1159,3 \pm 95,1$ UI/L, onde a morfologia apresentou-se como *pellets* de diâmetro médio de 3,04 mm.

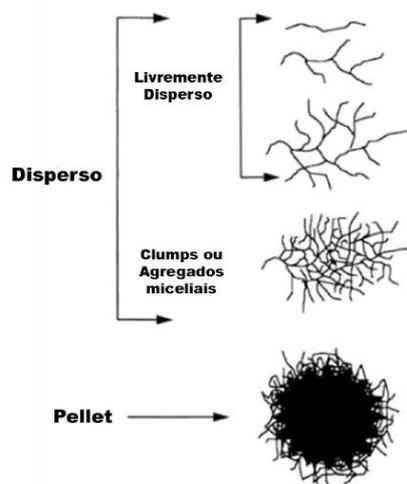
1. INTRODUÇÃO

Um dos principais resíduos agrícolas brasileiros é o bagaço de cana-de-açúcar, gerado a partir do processamento da matéria-prima para a produção de sacarose e etanol. Uma das alternativas para aumentar a produção de biocombustíveis que ainda leva em consideração a reutilização de materiais lignocelulósicos como resíduos agrícolas é a conversão de bagaço em bioetanol de segunda geração (2G).

Celulases, enzimas que hidrolisam a celulose dos materiais lignocelulósicos, são tradicionalmente produzidas por fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. As condições de cultivo desses microrganismos são de grande importância para uma produção bem-sucedida dessas enzimas. Tais condições, como o pH e concentração de esporos, também influenciam a morfologia dos fungos filamentosos (PAPAGIANNI e MATTEY, 2006; COLIN et al., 2013) que, por sua vez, afetam a produção de diferentes metabólitos. Porém, poucos trabalhos presentes na literatura comprovam qual a melhor morfologia para a produção de celulases, especificamente, endoglucanase, exoglucanase e beta-glicosidase.

O crescimento morfológico apresenta duas principais classificações; crescimento disperso, que inclui aglomerados (*clumps*), hifas ramificadas e isoladas e *pellets*. As células dispersas são supridas com oxigênio e nutrientes uniformemente; já os aglomerados de células grandes podem conter um núcleo interno com biomassa essencialmente inativa ou mesmo morta. Por outro lado, uma morfologia completamente dispersa pode levar a um caldo de cultivo muito viscoso, o que também dificulta a transferência de oxigênio meio líquido (DRIOUCH et al., 2012). A forma pelletizada também é apresentada por autores com a vantagem de facilitar processos de separação à jusante (CALLOW e JU, 2012). A Figura 1 representa esquematicamente os tipos de morfologias dos fungos filamentosos.

Figura 1 - Representação esquemática do crescimento morfológico de fungos filamentosos.



Fonte: Adaptado (QUINTANILLA *et al.*, 2015)

Ahamed e Vermette (2009) concluíram que a melhor morfologia para produção de celulases por *Trichoderma reesei's* seria a dispersa, onde os melhores resultados apresentaram hifas mais alongadas e ramificadas.

Estudos de Papagianni e Mattey (2006) relacionados com a produção de ácido cítrico por *A. niger* permitiram uma quantificação da transição entre as duas formas morfológicas extremas, de *pellets* para micélio livremente disperso, sendo a quantidade de *pellets* maior em inóculo com concentração de 10^4 esporos/mL, decaindo até uma morfologia totalmente dispersa a partir da concentração de inóculo de 10^8 esporos/mL.

Outro fator importante relatado para o controle morfológico é o pH do meio de cultura. Em cultivos de *A. niger*, Colin et al. (2013) observaram que em pH 2,0 houve uma menor adesão de esporos no início e ao longo do cultivo, o que resultou em uma morfologia dispersa. O aumento do pH favoreceu a adesão dos esporos ao longo do tempo e o resultado obtido foi uma morfologia pelletizada. O tamanho e a concentração dos *pellets* variaram de pequenos e em grande número em pH 3,0, até grandes e em pequeno número em pH 8,0. Apesar de tais trabalhos relatarem sucesso no controle da morfologia de *A. niger*, é conhecido na literatura que o crescimento desse fungo é de difícil controle morfológico, sendo que os resultados podem variar de acordo com a cepa. Além disso, os últimos trabalhos relatados não utilizaram a mudança morfológica com o intuito de verificar a produção de celulases. Isto posto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as influências do pH e da concentração de esporos na forma de crescimento do fungo *A. niger*, assim como na atividade de endoglucanase gerada pela morfologia resultante. Além disso, comparar as influências individuais das duas variáveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A composição do meio de cultivo das etapas de crescimento e produção foi baseada na proposta de Mandels e Sternberg (1976) com adaptações (CUNHA et al., 2015), tendo-se o acréscimo de lactose na etapa de produção de enzimas, com o intuito de induzir a produção das mesmas. Tanto a fase inicial de crescimento como o cultivo para produção de enzimas foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio de cultivo. A etapa de inóculo teve duração de 48 h e a etapa de produção, 72 h. Ambas as etapas foram realizadas em incubador rotativo (Solab, Modelo SL221) a 32°C e 200 rpm.

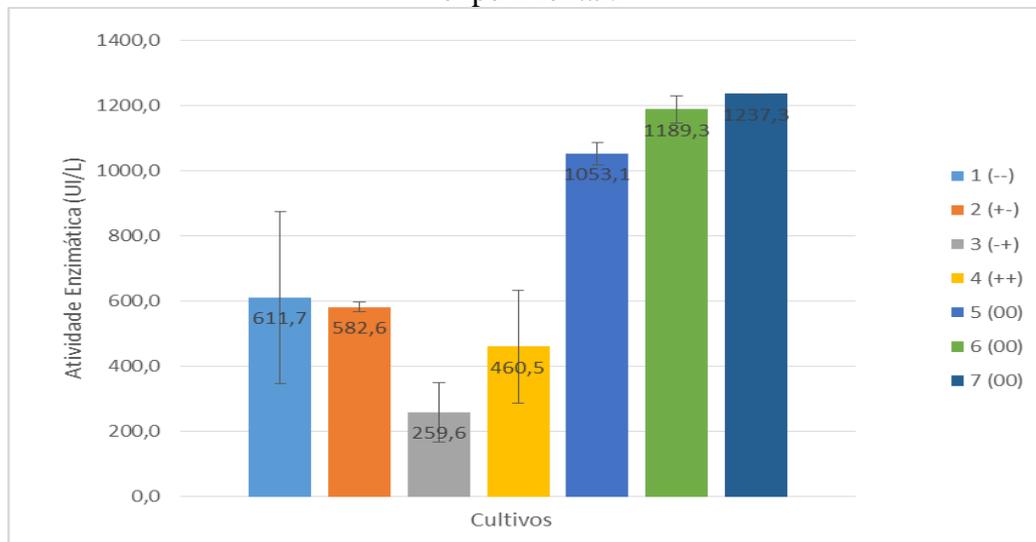
A concentração celular (C_x) foi obtida pelo método da massa seca, tanto da etapa de crescimento como na etapa de produção, através da filtração a vácuo e posterior lavagem de um volume determinado de caldo de cultivo. A determinação da atividade de endoglucanase teve como guia o procedimento de medida de atividade enzimática utilizando DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) como reagente utilizado pela EMBRAPA – Instrumentação (São Carlos, SP). Para medidas de absorbância utilizou-se o espectrofotômetro (Ultrospec, 2100 Pro). A atividade de endoglucanase foi obtida utilizando-se o método do CMC (Sigma, USA), que consiste numa solução de carboxi-metil-celulose 4% m/v preparada em tampão citrato de sódio, pH 4,8 (GHOSE, 1987).

O tratamento das imagens obtidas foi realizado através do software livre ImageJ (Versão 1.6.0_24). Com o objetivo de obter o tamanho médio dos *pellets* gerados na etapa de inóculo, inseriu-se cada imagem a ser tratada na aba do programa e, então, a mesma foi binarizada para que se pudesse ser feita a contagem dos objetos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de atividade de endoglucanase (em UI/L) são mostrados na Figura 2. As barras no gráfico indicam os desvios padrão entre as triplicatas de cada ensaio.

Figura 2. Atividade de Endoglucanase obtida ao final dos experimentos do planejamento experimental.

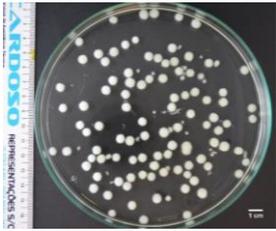


Fonte: Acervo Pessoal

Observa-se que os maiores valores de atividade enzimática ocorreram nos experimentos do ponto central, com pH 4,0 e concentração de 5×10^5 esporos/mL, que apresentaram *pellets* como morfologia resultante da etapa de crescimento. De acordo com a literatura, as maiores produções de celulase ocorrem quando o microrganismo cresce na forma dispersa. No entanto, no presente trabalho observou-se o oposto.

Calculou-se também a atividade específica, ou seja, a atividade por massa seca de fungo. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 1 juntamente com as morfologias obtidas.

Tabela 1. Morfologia resultante e atividades específicas por experimento.

Experi-mento	Morfologia	Atividade Específica (UI/g)
1 (--)		91,7
2 (+-)		90,2
3 (-+)		27,4



4 (++)



56,4

5, 6, 7
(00)



123,4

Fonte: Acervo Pessoal.

Para os tempos finais de cultivo, os *pellets* apresentaram geometria circular, onde o diâmetro da estrutura torna-se a dimensão característica. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de diâmetros médios no tempo de cultivo de 48 h para todos os experimentos realizados.

Tabela 2. Diâmetros dos pellets em todos os ensaios.

Experimento	1 (--)	2 (+-)	3 (-+)	4 (++)	5, 6, 7 (00)
Diâmetros Médios (mm)	Sem <i>Pellets</i>	0,60	2,72	0,34	3,04
Desvio Padrão (mm)	-	0,13	0,60	0,18	0,98

Fonte: Acervo Pessoal.

O diâmetro médio resultante do final da etapa de inóculo (48 h) apresentou valor que se encontra dentro da faixa de diâmetros descrita por Barroso (2006) para esse mesmo fungo. Observando-se as imagens, nota-se que há uma grande variedade de tamanhos de *pellets* e esses se encontram em escala macroscópica. A Tabela 3 apresenta a porcentagem, calculada através da área, dos tipos de morfologia predominantes nos experimentos realizados.

Tabela 3. Porcentagem morfológica dos ensaios.

Experimento	1 (--)	2 (+-)	3 (-+)	4 (++)	5, 6, 7 (00)
<i>Pellets</i> (%)	0,0	5,3	100,0	29,0	100,0
<i>Clumps</i> (%)	100,0	94,7	0,0	71,0	0,0

Fonte: Acervo Pessoal.

A partir de uma análise qualitativa dos resultados apresentados na Tabela 3, é possível observar que nos experimentos 1 e 2, onde o pH foi mantido em 2,0 e variou-se a concentração de esporos, o aumento da concentração dos mesmos no meio resultou numa pequena porcentagem de *pellets* presentes ao final do cultivo.

Ao se comparar os experimentos 1 e 3, onde a concentração de esporos no inóculo manteve-se baixa e o pH variou de 2,0 a 6,0, observam-se condições morfológicas extremas, pois no experimento 1 observou-se 100% de *clumps* e no 3, 100% de *pellets*, indicando que o pH é uma variável determinante na morfologia final do microrganismo.

Comparando os experimentos 3 e 4, onde o pH manteve-se em 6,0 e, variando a concentração de esporos, é possível observar que a maior concentração de esporos no meio induz o crescimento predominantemente na forma dispersa, diferente da condição com menor



concentração de esporos.

Ao se comparar os experimentos 2 e 4 com alta concentração de esporos, observam-se morfologias majoritariamente na forma dispersa. No entanto, o aumento do pH proporcionou um aumento na porcentagem de *pellets* resultantes.

4. CONCLUSÕES

Com relação ao planejamento fatorial, a combinação das variáveis pH 4,0 e concentração de 5×10^5 esporos/mL, respectivamente, resultaram em uma morfologia final na forma de *pellets*. Além disso, os ensaios de atividade enzimática para a morfologia *pellets* forneceram resultados elevados. O aumento do pH promoveu um aumento na porcentagem de *pellets* resultantes e, mantendo-se o pH elevado, a formação de pellets ocorreu quando a concentração do inóculo era baixa.

5. REFERÊNCIAS

- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*. V.100, p. 5979-5987, 2009.
- BARROSO, C. B., Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger*. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2006.
- CALLOW, N. V.; JU, L. K. Promoting *pellet* growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 50, p. 311-317, 2012.
- COLIN, V. L.; BAIGORII, M. D.; PERA, L. M. Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications. *Amb Express*, V. 3, p. 13, 2013.
- CUNHA, F. M. et al. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method. *Biochemical Engineering Journal*, v. 97, p. 32-39, May 2015.
- DRIOUCH, H. et al. Improved enzyme production by *bio-pellets* of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 109, p. 462-471, 2012.
- GHOSE, T. K. Measurement Of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p.257-268, Feb 1987.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in celulase technology. *Fermentation Technology*, n.54, p.256-286, 1976.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*. V. 5, p. 1-12, 2006.
- QUINTANILLA, D. et al. Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production-Modelling and Monitoring. In: KRULL, R. e BLEY, T. (Ed.). *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.149, p. 29-54, 2015.