

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Instituto de Biociências, Campus São José do Rio Preto

Catarina Artagoitia da Silva

**OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus sp* LBBIO-01 EM MELAÇO DE CANA DE
AÇÚCAR SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA**

São José do Rio Preto

2025



Catarina Artagoitia da Silva

**OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus sp* LBBIO-01 EM MELAÇO DE CANA DE
AÇÚCAR SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Campus SJ Rio Preto,
para obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Valéria Marta
Gomes do Nascimento

São José do Rio Preto

2025

A784o	Artagoitia da Silva, Catarina Obtenção de Biomassa de <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01 em melaço de cana de açúcar subproduto da indústria sucro-alcooleira / Catarina Artagoitia da Silva. -- São José do Rio Preto, 2025 75 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Valéria Marta Gomes do Nascimento 1. Sustentabilidade. 2. Fermentação. 3. Subproduto agroindustrial. 4. Nitrogênio. I. Título.
-------	---

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A otimização do cultivo de microrganismos tem recebido grande destaque, principalmente, devido às diversas descobertas de propriedades imunológicas destes e de seus biocompostos. Sabendo disso, tem se interesse tanto comercial quanto social em melhorar a sua produção, buscando o avanço científico e qualidade de vida da população em âmbito mundial, uma vez que, há também a valorização da medicina fundamentada em produtos naturais e da biotecnologia industrial que buscam soluções revolucionárias para crises globais. Buscar métodos utilizando como recurso subprodutos agroindustriais como o melaço, que barateiam e otimizam a produção, contribui cientificamente para o avanço da sustentabilidade e valorização desse Reino (Fungi) que é ainda pouco conhecido e possui tantos fatores que podem mudar o rumo das pesquisas atuais.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The optimization of the cultivation of microorganisms has received great attention, mainly due to the various discoveries of immunological properties of these and their biocompounds. Knowing this, there is both a commercial and social interest in improving its production, seeking scientific advancement and quality of life for the population worldwide, since there is also the appreciation of medicine based on natural products and industrial biotechnology that seek revolutionary solutions to global crises. Searching methods using agro-industrial by-products such as molasses as a resource, which make production cheaper and optimize, contributes scientifically to the advancement of sustainability and appreciation of this Kingdom (Fungi) which is still little known and has so many factors that can change the direction of current research.

Catarina Artagoitia da Silva

**OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus sp* LBBIO-01 EM MELAÇO DE CANA DE
AÇÚCAR SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus SJ Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Data da defesa: 26/02/2025.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Marta Gomes do Nascimento
Instituto de Biociências, Campus SJ Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Alessandra Machado Baron
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Dr^a. Bruna Escaramboni
Universidade Estadual Paulista - Campus Assis

Dedico este trabalho à minha família e ao
avanço da ciência voltada aos microrganismos.

AGRADECIMENTOS

Para a realização e finalização deste trabalho pude contar com pessoas extraordinárias que somaram de forma única em cada etapa dessa formação acadêmica.

Primeiro um agradecimento à minha orientadora, Valéria, por me acolher no final da graduação e por todo o conhecimento compartilhado até o momento.

À minha mãe Marina, meu pai Roberto e minha irmã Rebeca, pela confiança e força fornecidas durante todos esses anos dedicados à profissão.

Aos meus amigos Amanda, Caroline, Gabriel, João Guilherme e João Carlos, que estiveram comigo em muitos momentos difíceis e sempre depositaram uma palavra de conforto.

Ao meu namorado Lucas, pelo apoio e confiança.

Às doutoras Alessandra e Bruna por terem aceitado e disponibilizado seu tempo para participar da defesa desta dissertação.

Para finalizar, ao professor e profissional de laboratório, Bruno Henrique, que me auxiliou em muitos momentos de dúvidas na execução de processos laboratoriais.

O presente trabalho foi realizado, também, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O que te faz especial não é o ‘sim’ que você
ouve, o que te faz especial é o ‘não’ que você
fala”

(Djonga, Tasha & Tracie- até a sua alma, 2022).

RESUMO

Algumas espécies de *Rhizopus sp.* podem ser matéria-prima na produção de substâncias GRAS (generally recognized as safe) por serem considerados seguros e, portanto, podem ser utilizados como aditivos alimentares. Por esta mesma razão, *Rhizopus sp.* são utilizados para enriquecimento proteico em alimentos e atividade antioxidante, produção de enzimas, polissacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos essenciais. Entretanto, as condições de produção precisam ser estudadas para que a obtenção de biomassa de *Rhizopus sp.* em escala industrial tenha custo-benefício adequado às aplicações biotecnológicas. Para isso, é de suma importância a aplicação de subprodutos agroindustriais, ricos em nutrientes e de baixo custo, como insumo no bioprocessamento. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de biomassa de *Rhizopus sp.* LBBIO-01 em subproduto agroindustrial - melaço de caldo de cana de açúcar, visando aplicação biotecnológica do micélio fúngico. Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura, sob agitação de 180 rpm a 30 °C. Foi utilizado como meio de cultura padrão saís de Vogel e variáveis, sacarose ou melaço de cana de açúcar. Os cultivos foram acompanhados pela medida de biomassa (gravimetria), açúcar redutor (método do ácido-3,5dinitrosalicílico), açúcar redutor total e açúcar total (método Fenol-Sulfúrico), proteínas (métodos de Bradford) e pH (pHmetro). Nos cultivos em meio sólido em placas de Petri, com sacarose ou melaço (1 a 10 g/L), observou-se que com melaço houve preenchimento da área total da placa em 30 h (6 horas a menos do que com sacarose), mesmo na menor concentração (1g/L). Em fermentação submersa obteve-se o máximo de biomassa de 5,5 g/L em 60 h de cultivo utilizando melaço 50 g/L e 2,8 g/L em 36 h, com sacarose. Nos cultivos com melaço, a fase exponencial de crescimento foi observada até 24 h de cultivo, com velocidade específica de crescimento de 0,177 g/Lh⁻¹. Utilizando sacarose, observou-se fase exponencial até 36 h e velocidade específica de crescimento de 0,092 g/Lh⁻¹. Calculando-se o rendimento da produção de biomassa (g biomassa/g açúcar) em 24 h de cultivo, obteve-se 0,0742 g/g; 0,26 g/g e 0,52 g/g em melaço a 10, 25 e 50 g/L, respectivamente. Observou-se maior crescimento da biomassa utilizando sulfato de amônio e extrato de levedura com 8 g/L em horários diferentes, porém se encontra desvantagens em trabalhar com esses meios em maior escala. Cultivos em escala aumentada em 4 vezes resultaram na mesma produção de biomassa e no mesmo aspecto morfológico das hifas. Pôde-se concluir que quanto maior a concentração de melaço, maior a velocidade de crescimento e que fontes inorgânicas de nitrogênio, como nitrato de amônio, podem desempenhar melhor produtividade de crescimento, assim como, baratear o cultivo fúngico em larga escala.

Palavras-chave: Sustentabilidade; fermentação; subproduto agroindustrial; nitrogênio.

ABSTRACT

Some species of *Rhizopus sp.* can be used as raw materials in the production of GRAS (generally recognized as safe) substances because they are considered safe and, therefore, can be used as food additives. For this same reason, *Rhizopus sp.* are used for protein enrichment in foods and antioxidant activity, production of enzymes, polysaccharides, amino acids and essential fatty acids. However, production conditions need to be studied so that obtaining *Rhizopus sp.* biomass on an industrial scale has a cost-benefit ratio suitable for biotechnological applications. For this, it is extremely important to apply agro-industrial by-products, rich in nutrients and low cost, as input in the bioprocess. The present study aimed to obtain *Rhizopus sp.* LBBIO-BL01 biomass from an agro-industrial by-product - sugarcane juice molasses, aiming at the biotechnological application of the fungal mycelium. The microorganisms were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture medium, under agitation of 180 rpm at 30 °C. Vogel's and variable salts, sucrose or sugar cane molasses were used as standard culture medium. The cultures were monitored by measuring biomass (gravimetry), reducing sugar (3,5-dinitrosalicylic acid method), total reducing sugar and total sugar (phenol-sulfuric method), proteins (Bradford methods) and pH (pH meter). In the cultures in solid medium in Petri dishes, with sucrose or molasses (1 to 10 g/L), it was observed that with molasses there was filling of the total area of the plate in 30 h (6 hours less than with sucrose), even at the lowest concentration (1 g/L). In submerged fermentation, the maximum biomass of 5.5 g/L was obtained in 60 h of culture using 50 g/L molasses and 2.8 g/L in 36 h, with sucrose. In the cultures with molasses, the exponential growth phase was observed up to 24 h of culture, with a specific growth rate of 0.177 g/Lh⁻¹. Using sucrose, an exponential phase was observed up to 36 h and a specific growth rate of 0.092 g/Lh⁻¹. Calculating the biomass production yield (g biomass/g sugar) in 24 h of cultivation, 0.0742 g/g; 0.26 g/g and 0.52 g/g were obtained in molasses at 10, 25 and 50 g/L, respectively. Greater biomass growth was observed using ammonium sulfate and yeast extract with 8 g/L at different times, but there are disadvantages in working with these media on a larger scale. Cultivations on a 4-fold increased scale resulted in the same biomass production and the same morphological aspect of the hyphae. It was concluded that the higher the molasses concentration, the higher the growth speed and that inorganic nitrogen sources, such as ammonium nitrate, can improve growth productivity, as well as reduce the cost of large-scale fungal cultivation.

Keywords: Sustainability; fermentation; agro-industrial byproduct; nitrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Representação esquemática: ciclo de vida e reprodução do gênero <i>Rhizopus sp.</i>	19
Figura 2 – Proposta de estrutura de EPS secretado por <i>R. nigricans</i> .	20
Figura 3 – A) Erlenmeyers preparados para cultivo dentro do fluxo laminar recebendo luz UV. (B) e (C) Crescimento micelial em meio líquido em 12 h de crescimento.	28
Figura 4 – Imagem de crescimento micelial de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 em meio sólido contendo melaço de cana de açúcar, 30 °C, 72 h, aquisição em lupa Biotika com aumento de 7 vezes.	31
Figura 5 – Corpo de frutificação de <i>Rhizopus sp</i> , com presença de dispersão de esporos. Condição de análise: microscópio óptico Olympus CX41, coloração com azul de lactofenol, aumento de 40x.	32
Figura 6 – Crescimento de <i>Rhizopus sp</i> em meio sólido de melaço a 1 g/L e sais de Vogel, preenchendo a placa com 36 h de cultivo. Aquisição em lupa Biotika com aumento de 7 vezes.	35
Figura 7 – Média de crescimento do halo micelial em centímetros de <i>Rhizopus sp</i> em meio sólido de sacarose e melaço a 1, 5, 10 g/L e sais de Vogel	36
Figura 8 – Média de crescimento do halo micelial em centímetros de <i>Fusarium sp. sp</i> em meio sólido de sacarose e melaço a 1, 5, 10 g/L e sais de Vogel.	36
Figura 9 – Registros fotográficos do crescimento de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 e <i>Fusarium sp</i> LBBIO-03 em meio de cultivo sólido contendo sais de Vogel e sacarose.	37
Figura 10 – Registros fotográficos do crescimento de <i>Rhizopus sp</i> em meio de cultivo sólido contendo sais de Vogel e melaço	39
Figura 11– Produtividade do crescimento micelial de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 em meio sólido contendo sais de Vogel, sacarose ou melaço de caldo de cana de açúcar.	42
Figura 12 – Produtividade do crescimento micelial de <i>Fusarium sp</i> LBBIO-03 em meio sólido contendo sais mínimos de Vogel, sacarose ou melaço de caldo de cana de açúcar.	43
Figura 13 – Crescimento celular em cultivos de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono	44
Figura 14 –Determinação de pH em cultivos de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-	45

BL01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono

Figura 15 – Determinação de açúcar redutor em cultivos de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-BL01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono	46
Figura 16 – Amostra micelial de 25 g/L de sacarose, 10, 25 e 50 g/L de melaço respectivamente, coletadas em 24 horas de cultivo	47
Figura 17 – Imagens microscópicas de micélio de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 em fermentação submersa.	48
Figura 18– Determinação de crescimento celular em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono	49
Figura 19 – Determinação de açúcar redutor em cultivos de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-BL01 utilizando melaço 10 g/L (■) ou melaço 25 g/L (●) melaço 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono	50
Figura 20 – Determinação de pH em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono	51
Figura 21 – Determinação de proteínas em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono	52
Figura 22 – (A) Biomassa recolhida em 24 h de cultivo: (1) sulfato de amônio, (2) extrato de levedura, (3) ureia. (B) Biomassa e caldo fermentado recolhidos em 48 h: (3) ureia, (1) sulfato de amônio e (3) extrato de levedura.	53
Figura 23 – Crescimento celular em cultivos de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 utilizando melaço como fonte de carbono e sulfato de amônio (■) ureia (●) extrato de levedura (▲) e nitrato de amônio (▼) como fonte de nitrogênio	54
Figura 24 – Determinação de açúcar redutor em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço como fonte de carbono e sulfato de amônio (■) ureia (●) extrato de levedura (▲) e nitrato de amônio (▼) como fonte de nitrogênio	55
Figura 25 – Determinação de pH em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço como fonte de carbono e nitrato de amônio (■) sulfato de amônio (●) ureia (▲) e extrato de levedura (▼) como fonte de nitrogênio.	56
Figura 26 –Determinação de proteínas em cultivos de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01 utilizando melaço como fonte de carbono e nitrato de amônio	57

(■) sulfato de amônio (●) ureia (▲) e extrato de levedura (▼) como fonte de nitrogênio

Figura 27 – Imagens do micélio de *Rhizopus* sp cultivado em meio de sais mínimos de Vogel e melaço 50 g/L. Condições de análise: Microscópio ótico Olympus CX41, aumento de 40x, corante azul de lactofenol 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos lotes de melaço de cana de açúcar.	33
Tabela 2 – Análise química melaço L2 realizada pela empresa Agrolab - Laboratório de Análises Agropecuárias Ltda.	34
Tabela 3 – Velocidade específica de crescimento μ (cm/h) na fase exponencial	41
Tabela 4 – Análise morfológica do micélio e conídios de <i>Rhizopus sp.</i> LBBIO-01. Condição de análise: Microscópio Leica modelo DmLS, Câmera Moticam 2300 3 M, aumento de 400 x. Cultivos em frascos de 2000 mL.	59
Tabela 5 – Cultivo de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 em meio com sais mínimos de Vogel, melaço de cana de açúcar 50 g/L e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, em frascos de diferentes dimensões.	60
Tabela 6 – Análise química da biomassa de <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 obtida em fermentação submersa com meio de cultura contendo sais mínimos de Vogel e melaço de cana de açúcar 50 g/L.	61
Tabela 7 – Composição em Carbono (%) de diferentes materiais orgânicos relacionados na literatura	68
Tabela 8 – Composição em Nitrogênio (%) de diferentes materiais orgânicos relacionados à literatura.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LBBIO	Identificação de cepas do laboratório de Bioquímica UNESP-Assis
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
h	Abreviatura para “horas”
EPS	Exopolissacarídeo
SPC	<i>Single Cells Protein</i>
EAA	Aminoácidos essenciais
VGA	Vogel, glicose e ágar
SMV	Sais mínimos de Vogel
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
TFPS	Polissacarídeos de <i>T. fuciformis</i>
DNS	Ácido-3,5dinitrosalicílico
MRS	Ágar De Man, Rogosa e Sharpe
BRIX	Escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis em uma solução de sacarose.

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Unidade de medida grama
g/L	Unidade de medida que indica a concentração em gramas de massa em um litro de solução
mL	Unidade de medida miligrama
mg/mL	Unidade de medida que indica a concentração em miligramas de massa em um mililitro de solução
KDa	Unidade de medida que indica a massa molecular de moléculas biológicas
°C	Unidade de medida da temperatura na escala Celsius
cm	Unidade de medida de comprimento, centímetros
p/v	% peso/volume, massa em g de soluto por 100 mL de solução
p/p	% peso/peso, massa em g de soluto por 100 g de solução
μ	Unidade de medida de velocidade específica de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E GÊNERO <i>Rhizopus sp</i>	18
1.1.1	Fungos filamentosos	18
1.1.2	<i>Rhizopus sp.</i>	19
2.	POTENCIAIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA DE FUNGOS DO GÊNERO <i>RHIZOPUS</i>	21
3.	MELAÇO: INTRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO	23
4.	OBJETIVO	25
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	MICRORGANISMOS	26
5.2	OBTENÇÃO DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>)	26
5.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA	27
5.3.1	Cultivo em meio sólido	27
5.3.2	Fermentação submersa	27
5.3.2.1	<i>Preparo do inóculo</i>	27
5.3.2.2	<i>Cultivos em frascos agitados</i>	27
5.3.3	Cálculos de parâmetros de produção	29
5.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	29
5.4.1	Determinação de biomassa	29
5.4.2	Determinação de Açúcar redutor, Açúcar redutor total e Açúcar total	29
5.4.3	Determinação de proteínas	30
5.4.4	Determinação de pH	30
5.5	ANÁLISE QUÍMICA DA BIOMASSA	30
5.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	30
6.	RESULTADOS	31
6.1	IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	31
6.2	ANÁLISES QUÍMICAS DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR	32
6.3	DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR OU SACAROSE	34
6.4	OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus sp</i> LBBIO-01 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COMPARANDO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO	43
6.4.1	Determinação da biomassa	43
6.4.2	Determinação de pH	45
6.4.3	Determinação de açúcar redutor	45
6.4.4	Determinação de proteínas	46
6.5	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO NA OBTENÇÃO DE	

	BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp. LBBIO-01	46
6.5.1	Análise morfológica	47
6.5.2	Determinação da biomassa	48
6.5.3	Determinação de açúcar redutor e açúcar redutor total	49
6.5.4	Determinação de pH	50
6.5.5	Determinação de proteínas	51
6.6	EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01	52
6.6.1	Determinação de biomassa	53
6.6.2	Determinação de açúcar redutor e açúcar redutor total	55
6.6.3	Determinação de pH	55
6.6.4	Determinação de proteínas	56
6.7	PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01 EM MELAÇO E SAIS DE VOGEL EM ESCALA AUMENTADA	57
6.7.1	Análise morfológica	57
6.7.2	Parâmetros de produção	59
6.8	ANÁLISE QUÍMICA DA BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01 OBTDA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	60
7.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	62
7.1	UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01	62
7.2	EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01	65
7.3	OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01 EM ESCALA AUMENTADA	67
7.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MICÉLIO DE <i>Rhizopus</i> sp LBBIO-01.	67
8.	CONCLUSÕES	70
8.1	EFICIÊNCIA DO MELAÇO COMO FONTE DE CARBONO	70
8.2	EFICIÊNCIA DAS FONTES DE NITROGÊNIO	70
8.3	DIFERENÇAS NO PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR	70
8.4	PRODUTIVIDADE E CONSUMO DE CARBONO	70
8.5	IMPACTO NO pH DO MEIO DE CULTURA	71
8.6	PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	71
8.7	PESQUISAS FUTURAS	71
	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Pertencente ao Reino Fungi, Filo Zygomycota, Classe Zygomycetes, Ordem Mucolares e Família Mucolaceae, o gênero *Rhizopus* (EHRENBERG, 1821) (Figura 1) é comumente encontrado na decomposição de vegetais, no solo e excrementos de animais (PIDOPLICHKO e MIL'KO, 1971). Mesmo sendo patógeno em plantações, o gênero tem considerável relevância às atividades humanas quando utilizado na fabricação de alimentos produzindo enzimas para biofermentação, se tornando alvo em pesquisas de biologia molecular e celular de fungos (MUSZEWSKA; PAWŁOWSKA; KRZYŚCIAK, 2014).

Algumas espécies de *Rhizopus sp.* podem ser matéria-prima na produção de substâncias GRAS (*generally recognized as safe*) por serem considerados seguros e, portanto, podem ser utilizados como aditivos alimentares. Por esta mesma razão, os *Rhizopus sp.* são utilizados para enriquecimento proteico em alimentos e atividade antioxidante (*R. stolonifer*), outros podem apresentar alta aplicação, tanto na produção de alimentos quanto na alta variedade de produção de enzimas (*R. oryzae*) e também, controle microbiológico (MIYAOKA, 2012). As espécies de *R. oryzae* e *R. oligosporus* são utilizadas na fabricação de alimentos, como produção de tempeh e tofu, que são produtos fermentados feitos a partir de grãos. Além disso, na Ásia, são utilizadas na produção de bebidas alcoólicas. Algumas aplicações menos comuns incluem produção de biopolímeros, bioemulsificantes e biossurfactantes (MIYAOKA, 2012).

Sabendo disso, este trabalho busca a otimização de cultivo do microrganismo *Rhizopus sp* com foco na produção e utilização biotecnológica de biocompostos produzidos pelo seu micélio. Para isso se determina alguns parâmetros de crescimento em diferentes concentrações de carbono disponíveis e diferentes fontes de nitrogênio, aliados no melhoramento do crescimento microbiano.

Como fonte de nitrogênio, se propõe utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio como nitrato de amônio e sulfato de amônio que barateia o processo fermentativo, assim como, utilização de fontes orgânicas como ureia e extrato de levedura que proporcionam quantificação nutricional ao processo.

O melaço utilizado no presente estudo é obtido como subproduto durante o processo industrial para produção de açúcar de mesa a partir da extração do caldo da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). Se propõe uso do melaço no processo fermentativo visando redução de custo para a viabilidade do bioprocesso, já que a utilização de subprodutos está associada aos conceitos de Ecologia e Sustentabilidade Industrial, onde se tem interesse principal em

evitar a poluição ambiental, minimizando o descarte na natureza, em contrapartida, reduzindo a busca por matérias primas quando um subproduto de um processo é reutilizado como matéria prima em outro (BUENO, 2016).

O aproveitamento de subprodutos agroindustriais em laboratório promove práticas mais sustentáveis vinculadas à ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável), com foco em prevenir o desperdício, promover a renovação e o bom uso de recursos. Assim, segundo a Secretaria de Meio Ambiente (2025), contribui-se para valorização desses resíduos e a economia circular e corroborando com o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao diminuir os impactos ambientais incentivando o reaproveitamento. Para além, essa abordagem também pode resultar em novas soluções para a indústria, como biocombustíveis, alimentos mais nutritivos ou materiais ecológicos, apoiando ainda os ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e 13 (Ação Contra a Mudança Climática).

1.1 CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E GÊNERO *Rhizopus* sp.

1.1.1 Fungos filamentosos

Organismos eucariontes, os fungos podem ser classificados como unicelulares (leveduras), ou multicelulares (por ex. fungos filamentosos). Um fungo unicelular é constituído de uma única célula, maior que uma bactéria, de formato oval. Já um fungo multicelular, é capaz de produzir estruturas denominadas de micélios ou hifas. Assim como as plantas, os fungos possuem parede celular em sua estrutura, a qual é composta por substâncias como quitina, celulose e glicana, caracterizando sua rigidez (TORTORA *et al.*, 2017).

Os fungos filamentosos podem possuir reprodução sexuada através da fusão de gametas e esporos sexuados, ou, reprodução assexuada por esporos assexuados encontrados em hifas aéreas. A germinação dos esporos, pelo inchaço dos tubos germinativos, é intrinsecamente dependente da otimização de cultivo em melhor temperatura, pH, fonte carbono, fonte de nitrogênio etc. (MIYAOKA, 2012).

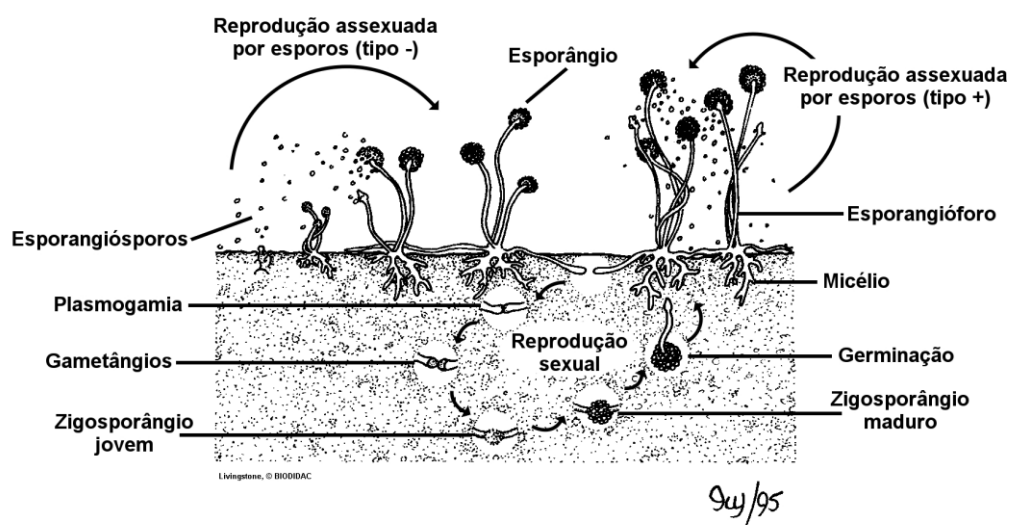
Os microrganismos desse reino compreendem importante função no meio ambiente operando como decompositores de matéria orgânica, absorvendo nutrientes do solo, madeira ou outros substratos, assim como, atuando em simbiose com plantas, como as micorrizas, participando do ciclo do nitrogênio, um nutriente tão essencial para a vida (TORTORA *et al.*,

2017). Também estão presentes na produção de medicamentos, como penicilina (MIYAOKA, 2012)

1.1.2 *Rhizopus sp.*

Em análise filogenética Liu *et al.* (2024) revelou que o gênero *Rhizopus* é construído por três clados principais: *R. microsporus* a espécie basal, com *R. stolonifer* como sua linhagem irmã, e duas espécies próximas: *R. arrhizus* e *R. delemar*. Já Miyaoka (2012) destaca *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circicans*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus formosa*, e *Rhizopus stolonifer* como as principais espécies desse gênero. Características micromorfológicas dos esporângios, esporangiósporos e esporangióforos, assim como a presença ou ausência de zigósporos podem diferenciar as espécies.

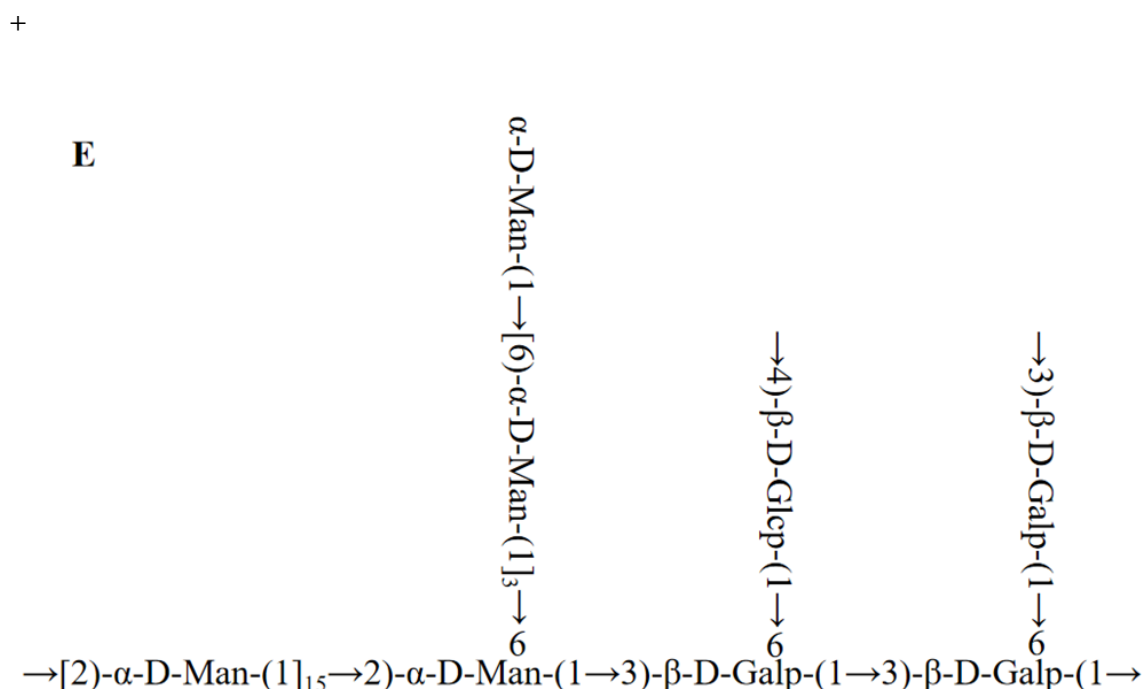
Figura 1: Representação esquemática: ciclo de vida e reprodução do gênero *Rhizopus sp.*



Fonte: Casa das Ciências, 2014.

Dentro do gênero *Rhizopus*, a espécie *R. nigricans* tem sido estudada quanto à produção de exopolissacarídeo (EPS). Yu *et al.* (2016), descreveu a estrutura de um EPS, denominado EPS1-1, trata-se de um heteropolissacarídeo contendo os monossacarídeos glicose, manose, galactose e frutose na razão molar 5,89: 3,64 : 3,20 : 1,00. Li *et al.* (2022) caracterizam um segundo EPS, denominado EPS2-1, um heteropolissacarídeo composto de manose (Man), galactose (Gal), glicose (Glc), arabinose (Ara) e Fucose (Fuc), com massa molar de 32,803 kDa. Uma proposta estrutural do EPS2-1 está na figura 2.

Figura 2: Proposta de estrutura de EPS secretado por *R. nigricans*.



Fonte: Li *et al.* (2022).

Sobre o EPS1-1, verificou-se potencial para imunoterapia ou adjuvante no tratamento de câncer colorretal (YU *et al.*, 2018) (a). Yan *et al.* (2022) relatou inibição de células tumorais relacionadas a câncer de fígado. Yu *et al.* (2018) (b) verificou que o EPS1-1 poderia suprimir a metástase *in vitro* e *in vivo*, inibindo a invasão e a angiogênese, o que fornece aplicação potencial contra a metástase do câncer colorretal. Por outro lado, Li *et al.* (2022) encontrou evidências de atividade antioxidante, potencial imunomodulatório e anticâncer em relação ao EPS2-1.

Chen *et al.* (2013) extraiu, purificou e analisou polissacarídeos de micélio de *R. nigricans*. Os autores descreveram um polissacarídeo composto de manose, ramnose, ácido glicurônico, glicose, galactose e fucose na razão molar de 5,1 : 1,0 : 1,6 : 92,2 : 1,3 : 2,3.

A cepa de *Rhizopus* sp. LBBIO-01 do presente trabalho tem sido estudada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UNESP- Campus Assis. Silva *et al.* (2023) cultivaram *Rhizopus* sp em soro de leite para obtenção de biomassa com valor alimentar animal. Os autores obtiveram 6 g/L de biomassa em 24 h de cultivo (29 °C e 180 rpm de agitação) e velocidade específica de crescimento de 0,0137 g/h.

2. POTENCIAIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA DE FUNGOS DO GÊNERO *RHIZOPUS*

O *Rhizopus microsporus var. oligosporus* aparece como um dos principais microrganismos produtores de micoproteínas voltadas à suplementação alimentar (FURLAN *et al.*, 2024) e, em muitos países asiáticos, é tradicionalmente utilizado na produção de alimentos fermentados. Dentre fungos filamentosos utilizados nesses processos o *Rhizopus microsporus var. oligosporus* (Rmo) é utilizado há séculos na produção de tempeh a partir da fermentação da soja. O tempeh, disponibiliza melhorias na digestibilidade de proteínas, sendo uma excelente alternativa proteica (SANDOVAL *et al.*, 2024). Ainda, a biomassa do fungo é rica em compostos bioativos como β -glucanos, reconhecidos por seus efeitos benéficos à saúde, incluindo atividade antioxidante e propriedades imunomoduladoras (FURLAN *et al.*, 2024).

Sabe-se que a fermentação em estado sólido tem sido amplamente valorizada no ramo alimentício. O estudo de Sandoval *et al.* (2024) levanta dados que unem as características bioquímicas do pão como substrato na fermentação de *Rhizopus oligosporus* a fim de evitar o desperdício desse alimento mundialmente consumido. Isto porque, além de fornecer glúten e amido, o pão possui em sua composição nutrientes essenciais para os microrganismos fermentadores em estado sólido, na sua maioria fungos filamentosos (SANDOVAL *et al.*, 2024).

Neste estudo, se explicita os valores nutricionais do pão excedente (cascas e migalhas de pão descartados) quando fermentado com o Rmo ao reduzir a concentração de amido (de 65,8% para 42,7%), da mesma maneira em que aumenta a quantidade de proteína bruta (de 13,2% para 16,1%) e fibras brutas (de 11,6% para 26,7%), enquanto eleva relativamente a proporção de aminoácidos essenciais (EAA), minerais e vitaminas (SANDOVAL *et al.*, 2024). Alguns fungos filamentosos, assim como o Rmo, realizam a síntese de proteases que quebram proteínas, alterando a característica de aminoácidos e aumentando a concentração de EAA, o que melhora a qualidade da proteína (SANDOVAL *et al.*, 2024).

A produção de proteínas unicelulares, *Single Cell Proteins* – SCP, vem se tornando uma alternativa para novas pesquisas que desenvolvam nutrientes essenciais de suplementos na alimentação humana (SILVA *et al.*, 2023). Podendo ser extraídas de microrganismos, as SCPs, contém altos níveis de proteínas, aminoácidos, além do baixo teor de gordura e carboidratos,

quando comparadas a forragens (SILVA *et al.*, 2023), por isso se destacam como suplementos nutricionais.

Fungos filamentosos, como do gênero *Rhizopus*, são capazes de produzir SCPs facilmente através da fermentação, também de maneira sustentável quando utilizados subprodutos industriais e alimentares. Esses microrganismos possuem em sua composição principalmente proteínas e ácidos nucleicos, além de lipídios e vitaminas do complexo B (SILVA *et al.*, 2023). A presença das glucanas em sua parede celular aumenta o teor de fibras quando ingerido na dieta humana, disponibilizando também outros micronutrientes essenciais (UIJANIA; QURESHI; SEVAK, 2022).

Os polissacarídeos de origem microbiana também têm sido objeto de intensa pesquisa, pois apresentam propriedades espessantes similares ou superiores aos de origem vegetal e de algas. Alguns deles também formam géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações e, em alguns casos, esses polímeros são utilizados como substratos para desenvolvimento de novos produtos, por exemplo, após uma derivatização química (BRANDI, 2011).

As β -glucanas são a forma predominante das glucanas produzidas por fungos, com ligações β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6) (GORIN e SPENCER, 1968). Esses carboidratos são obtidos tanto em EPS quanto nos extratos alcalinos e aquosos de corpos de frutificação (SYNYTSYA e NOVÁK, 2013). Glucanas, homopolissacarídeos formados por glicose, vêm recebendo muita atenção devido suas propriedades imunomoduladoras (SMIDERLE *et al.*, 2011, 2013), mediadoras da resposta da insulina à glicose na circulação sanguínea (REGAND *et al.*, 2011), antitumorais e anti-metastáticas (HARNACK *et al.*, 2009). Várias dessas moléculas bioativas são encontradas em cogumelos, como componentes de sua parede celular (BHANJA *et al.*, 2012; MAJI *et al.*, 2012).

3. MELAÇO

Subproduto da usina açucareira, o melaço é obtido durante o processo de fabricação do açúcar. Após a moagem da cana, o caldo passa pela clarificação, filtração, evaporação, cozimento e cristalização. Após a cristalização, o caldo é centrifugado, onde os cristais de açúcar são separados, gerando, simultaneamente, o melaço de cana líquido (MELLAÇO DE CANA, 2025).

O melaço ganhou destaque no Brasil devido ao seu alto teor de carboidratos, minerais e outros componentes que não foram cristalizados na produção de açúcar. A qualidade desse composto está conectada à matéria-prima utilizada e ao processo de fabricação do açúcar (OLIVEIRA *et al.*, 2019). O melaço participa de diversos processos biotecnológicos, como a produção de etanol, proteínas, rações, levedura para panificação e antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A fabricação de açúcar determina a disponibilidade de melaço, este que favorece a produção de etanol pelo baixo custo quando comparada ao mesmo processo a partir do açúcar. Quantitativamente, mais de 80 litros de etanol são obtidos por tonelada de cana processada, enquanto, utilizando o melaço, aproximadamente 12 litros de etanol são produzidos por tonelada de cana, além do açúcar produzido (OLIVEIRA *et al.* 2019). Isso evidencia que em várias nações latino-americanas com indústria açucareira, o melaço tem potencial para ser uma fonte importante de etanol, suprimindo a demanda interna por combustíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O melaço proveniente da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) consiste em uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo notáveis os açúcares sacarose, frutose e glicose, cujas proporções variam conforme o método de produção e a qualidade da matéria-prima utilizada (PALMONARI *et al.*, 2020). Além disso, é uma fonte abundante de minerais essenciais, como potássio, cálcio, magnésio, ferro e fósforo, os quais desempenham papel crucial no crescimento microbiano e em diversas funções metabólicas. Adicionalmente, contém quantidades reduzidas de vitaminas do complexo B, tais como tiamina, riboflavina e niacina, e compostos orgânicos, incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos e antioxidantes, que podem influenciar a atividade microbiana e a produção de metabólitos. (PALMONARI *et al.*, 2020).

O estudo de Yu *et al.* (2024) realizou análises da capacidade de crescimento em melaço a 10% e vinhaça bruta de cana de açúcar na produção de lipídios e proteínas em diversos microrganismos. Como resultados, o estudo relatou uma biomassa de 6,09 g/L de *C. lipolytica*

desenvolvido em melaço, enquanto *C. glutamicum* alcançou 46,16% de produção de proteínas também em melaço. Ainda, Yu *et al.* (2024) apresentou avaliação positiva na viabilidade de biossíntese de polissacarídeos de *T. fuciformis* (TFPS) com inoculação de seus esporos em melaço de cana de açúcar, o que comprova a eficiência deste subproduto como alternativa econômica na substituição da glicose em processos de fermentação. Todavia, a complexidade na composição do melaço pode determinar ajustes nos parâmetros de otimização da fermentação (YU *et al.*, 2024).

4. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de biomassa de *Rhizopus sp* LBBIO-01 em subproduto agroindustrial - melaço de caldo de cana de açúcar, visando a aplicação biotecnológica do micélio fúngico.

Objetivos Específicos

- a. Determinar a velocidade de crescimento fúngico em meio sólido em placas de Petri;
- b. Avaliar os parâmetros de crescimento e metabolismo em fermentação submersa em melaço 50 g/L e em diferentes concentrações;
- c. Quantificar o crescimento do microrganismo em melaço e diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, sulfato de amônio ureia, extrato de levedura);
- d. Estabelecer comparação das características morfológicas do microrganismo em crescimento com melaço em maior escala;
- e. Calcular em porcentagem a composição de carbono e nitrogênio da biomassa de *Rhizopus sp*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas, neste trabalho, as cepas de *Rhizopus* sp LBBIO-01, armazenadas na coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da FCLA (LBBIO), UNESP – Assis. A cepa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 foi isolada a partir de contaminação em morango e identificada morfológicamente, tanto por características macroscópicas das colônias, quanto pelas características microscópicas do micélio e corpo de frutificação observadas na figura 5. O fungo foi mantido em placas de Petri contendo meio VGA, com sais mínimos de Vogel (1956) (SMV), glicose (10 g/L) e ágar (15 g/L). O crescimento foi realizado em estufa a 30 °C e o armazenamento em geladeira a 4 °C.

Para visualização dos corpos de frutificação, foi realizada a técnica do microcultivo. Para isso, foi preparada uma placa de Petri contendo 2 lâminas de vidro. Cada lâmina de vidro recebeu uma gota de meio de cultura PDA (*potato, dextrose, ágar*), que após solidificação, foi inoculado com esporos da cepa de *Rhizopus* sp e recoberto com uma lamínula. As placas foram incubadas a 30 °C e o crescimento foi acompanhado a cada 24 h. Após o crescimento, a lamínula foi descolada, colocada em nova lâmina de vidro contendo corante Lactofenol e observado ao microscópio óptico.

Nos experimentos em meio sólido, foi utilizada para controle e comparação, uma cepa de *Fusarium* sp LBBIO-03. Essa cepa foi isolada em contaminação de banana e identificada no laboratório por análises morfológicas, macroscópicas e microscópicas. A cepa foi mantida na coleção de culturas do laboratório, em meio sólido PDA (*potato, dextrose, ágar*), a 4 °C.

5.2 OBTENÇÃO DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

O desenvolvimento dos experimentos demandou a utilização de 2 lotes de melaço. O primeiro lote (L1) foi disponibilizado pela Usina Biorigin Zilor CNPJ 60.855.574/0001-73 localizada na Fazenda Quatá, S/N, Quatá/SP, 19780-000. O segundo lote (L2) foi cedido pela Usina São Martinho CNPJ 51.466.860/0001-56, localizada na Fazenda São Martinho S/N - Zona Rural, Pradópolis/SP- 14850-000.

5.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA

5.3.1 Cultivo em meio sólido

Para avaliar a velocidade de crescimento em meio sólido a cepa de *Rhizopus* sp foi inoculada em placas de Petri contendo ágar 15 g/L, sais mínimos de Vogel (SMV), sacarose ou melaço de cana de açúcar (1; 5 e 10 g/L). As placas foram mantidas em caixa de isopor, a temperatura ambiente, com monitoramento feito por Termômetro Digital Temperatura Máxima/ Mínima, Interna/Externa. O halo de crescimento foi medido com régua (em cm) a cada 6 h, até que o micélio alcançasse a área total da placa. Para comparação e controle do experimento, foi inoculado simultaneamente, uma cepa de *Fusarium* sp, mantida nas mesmas condições. As medidas foram registradas também por imagem fotográfica, com celular Samsung Galaxy modelo A23 de câmera traseira de 50 megapixels, resolução de 8165 x 6124 pixels.

5.3.2. Fermentação submersa

5.3.2.1. Preparo do inóculo

Em um primeiro ensaio (Figura 3), a partir de placas de Petri contendo meio VGA, com 5 dias de crescimento, realizou-se inoculação de esporos em Erlenmeyers de 250 mL com mesmo meio sólido, incubados a 30 °C por 5 dias. A suspensão dos esporos foi realizada com uma solução de 100 mL de água destilada e 2 gotas de Tween 80. A solução foi transferida para os Erlenmeyers enquanto, estes, permaneciam em cima de um agitador magnético para leve varredura da superfície. Esse procedimento foi realizado previamente para todos os crescimentos apresentados neste trabalho. A cepa utilizada neste trabalho foi inoculada em microcultivo para visualização do corpo de frutificação visível ao microscópio óptico e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, também a microscópio óptico.

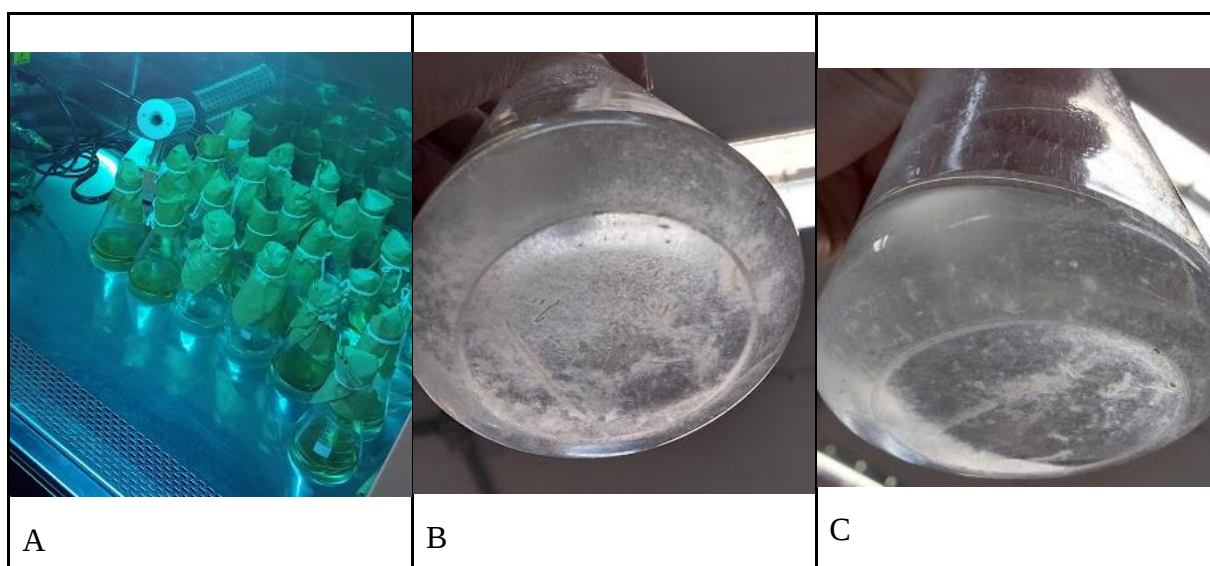
5.3.2.2. Cultivo em frascos agitados

O fungo *Rhizopus* sp LBBIO-01 foi cultivado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura ou Erlenmeyers de 2000 mL contendo 200 mL de meio de cultura, sob agitação de 180 rpm a 30 °C. Foram utilizados como meio de cultura sais de Vogel (com nitrato de amônio, extrato de levedura, sulfato de amônio e ureia) e sacarose 50 g/L ou melaço de cana de açúcar em 10, 25 ou 50 g/L. Os cultivos foram acompanhados pela medida de biomassa, açúcar redutor, proteínas e pH.

Primeiramente foi realizado um crescimento de *Rhizopus* sp comparando melaço e sacarose a 50 g/L como fontes de carbono. Posteriormente, se buscou definir a melhor concentração de melaço entre 10, 25 ou 50 g/L utilizando sais de Vogel como fonte de nitrogênio. Ainda, para avaliação da fonte de nitrogênio realizou-se crescimentos em meio de cultura contendo sais mínimos de Vogel, porém substituindo-se nitrato de amônio da composição original por fonte inorgânica $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e orgânicas (extrato de levedura ou ureia) de nitrogênio. A massa da fonte de nitrogênio foi calculada com base na massa molar do nitrogênio em cada reagente, fazendo sua equivalência com a concentração de nitrogênio do nitrato de amônio da fórmula original. Dessa forma, utilizou-se 72,5 g/L de sulfato de amônio, 37,5 g/L ureia e 175 g/L extrato de levedura. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura, melaço 50 g/L, a 30 °C, 180 rpm, por 72 h.

Cultivos em maior escala foram realizados com Erlenmeyers de 2000 mL e 200 mL de meio de cultivo. O meio de cultura era composto de sais mínimos de Vogel, melaço de cana de açúcar 50 g/L e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Os cultivos foram realizados em 6 frascos, mantidos em agitação de 180 rpm, 30 °C, 72 h.

Figura 3: (A) Erlenmeyers preparados para cultivo dentro do fluxo laminar recebendo luz UV. (B) e (C) Crescimento micelial em meio líquido em 12 h de crescimento.



Fonte: Autor, 2025

5.3.3 Cálculos de parâmetros de produção

A produtividade foi calculada pela razão entre a concentração de biomassa seca (g/L) pelo tempo de cultivo no momento da coleta (h) (P_x , Equação 1).

- Equação 1: $P_x = \frac{\text{biomassa seca } (\frac{g}{L})}{\text{tempo } (h)}$

A velocidade específica ou velocidade média de crescimento (μ) da biomassa foi determinada por regressão linear dos valores de crescimento (biomassa ou diâmetro de halo) na fase de crescimento de exponencial.

O rendimento foi calculado pela razão entre a concentração de biomassa seca (g/L) pela concentração de açúcar inicial adicionado ao meio de cultivo (g/L) (R_x , Equação 2).

- Equação 2: $R_x = \frac{\text{biomassa seca } (\frac{g}{L})}{\text{concentração de açúcar } (\frac{g}{L})}$

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1 Determinação de biomassa

O crescimento celular foi determinado por gravimetria. Após o cultivo, a biomassa fúngica foi separada por filtração em papel de filtro Whatman n.1, com auxílio de bomba de ar a vácuo. O papel contendo a biomassa foi seco em estufa a 60 °C até o peso constante.

5.4.2 Determinação de Açúcar redutor, Açúcar redutor total e Açúcar total

Para determinação do açúcar redutor foi realizado o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico adaptado do método descrito por Miller (1959), utilizando-se como padrão uma solução de glicose anidra a 2 mg/mL.

Para determinação do açúcar redutor total foi realizado hidrólise preliminar com HCl 6 mol/L, em banho maria a 100 °C. Posteriormente a amostra foi neutralizada com NaOH 2 mol/L e os açúcares liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico adaptado do método descrito por Miller (1959).

Para determinação do açúcar total foi realizado o método de fenol-sulfúrico, fundamentado por Dubois *et al.* (1956), onde é descrito que açúcares simples ou complexos, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado reagem de maneira sensível, apresentando uma coloração amarelo-alaranjado constante.

5.4.3 Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas do extrato bruto líquido e sobrenadante de fermentação submersa foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com padrão soro-albumina bovina.

5.4.4 Determinação de pH

O pH das amostras e do melaço foram realizados com a utilização de pHmetro.

5.5 ANÁLISE QUÍMICA DA BIOMASSA

As análises de carbono e nitrogênio do micélio de *Rhizopus* sp LBBIO-01 foram realizadas pela empresa Agrolab - Laboratório de Análises Agropecuárias Ltda, CNPJ 12980155000110 e tem sua sede localizada na Avenida Antonino José de Carvalho, 415 - Portal de São Francisco, Assis - SP, 19.807-490.

A metodologia utilizada foi baseada no Manual de Métodos Analíticos Oficiais de Fertilizantes, Corretivos, Substratos, Condicionadores e Remineralizadores de solo - volume I, publicado pelo Ministério da Agricultura, 2024.

5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados que foram encontrados nos ensaios, em triplicata, relatados neste projeto foram analisados por comparação de média e desvio padrão dos valores obtidos, através do software estatístico OriginPro – versão 10.1, Origin Lab Corporation.

6. RESULTADOS

6.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

A cepa foi inoculada em meio sólido, em placas de Petri, e incubada a 30°C, por 5 dias. Durante esse período, observou-se a formação de micélio aéreo, com aspecto de algodão. Com o passar dos dias, foram visíveis os esporos de coloração escura, que se destacavam nas pontas do micélio (Figura 4). Na Figura 5 é possível observar características como esporangiósporos e esporangióforos obtidos por microcultivo, bem como hifas não segmentadas. As características macroscópicas e microscópicas permitiram a identificação do fungo como pertencente ao gênero *Rhizopus*, conforme dados da literatura (BARNETT e HUNTER, 2000).

Morfologicamente, o micélio de fungos *Rhizopus* é multinucleado e asseptado (cenocítico), onde as células compartilham o citoplasma, característica da classe em que pertencem, os Zygomycetes (BARNETT e HUNTER, 2000). Os rizóides desse gênero, estruturas semelhantes às raízes das plantas, são ramificados, comumente crescem em formato de rede e em direção ao substrato (BARNETT e HUNTER, 2000). Os esporângios, estruturas esféricas que abrigam os esporos, são formados nas extremidades de esporangiócitos, hifas especializadas, e se rompem para dispersão voltada à reprodução assexuada (BARNETT e HUNTER, 2000).

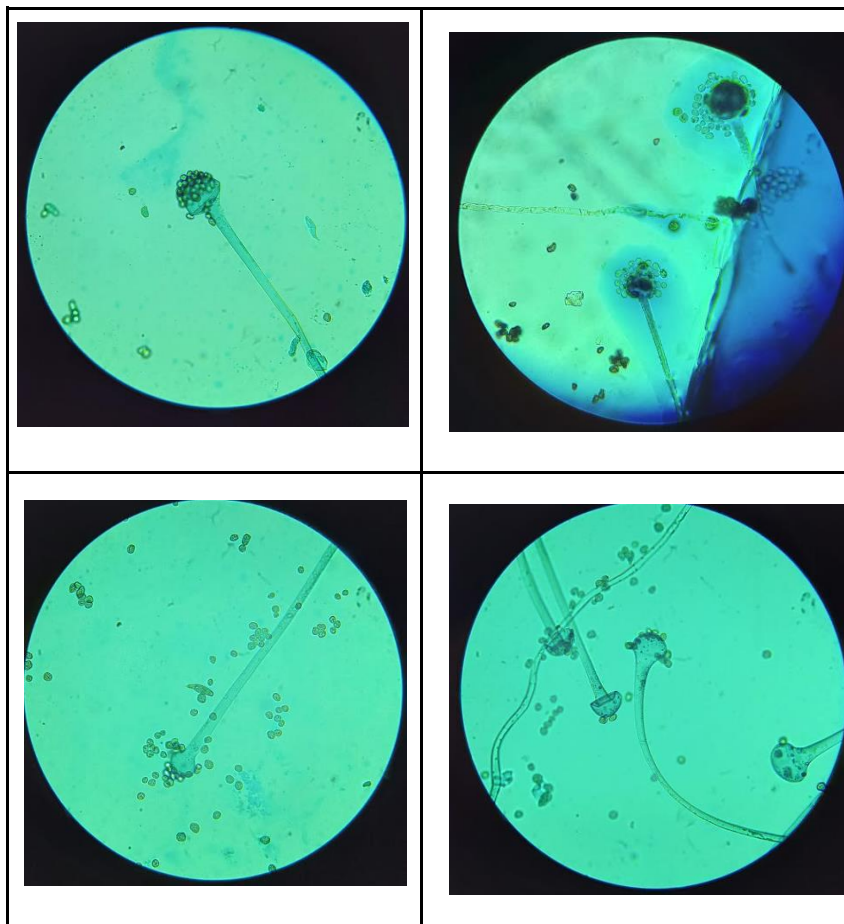
A reprodução sexuada é realizada através da formação de um zigosporângio, estrutura formada quando hifas de duas diferentes cepas de *Rhizopus* entram em contato, que se desenvolve dando origem ao zigósporo, uma estrutura de extrema resistência (BARNETT e HUNTER, 2000).

Figura 4: Imagem de crescimento micelial de *Rhizopus* sp LBBIO-01 em meio sólido contendo melaço de cana de açúcar, 30 °C, 72 h, aquisição em lupa Bioptika com aumento de 7 vezes.



Fonte: Autor, 2025

Figura 5: Corpo de frutificação de *Rhizopus sp*, com presença de dispersão de esporos. Condição de análise: microscópio óptico Olympus CX41, coloração com azul de lactofenol, aumento de 40x.



Fonte: Autor, 2025

6.2 ANÁLISES QUÍMICAS DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Os melaços L1 e L2 foram analisados quanto ao teor de açúcares redutores pelo método do DNS. Por outro lado, a quantificação de açúcar total foi feita por métodos diferentes: L1- açúcar redutor total pelo método DNS e L2 - açúcar total pelo método do Fenol Sulfúrico (Tabela 1). Ainda, visto que o L2 seria utilizado para o cultivo em maior escala houve a solicitação de análise de seus componentes (Tabela 2)

A análise do melaço L1 demonstrou 11% de açúcar redutor e 30% de açúcar total. Para o melaço L2, de maneira inesperada, os valores de açúcar total e redutor foram muito semelhantes (20%), indicando que o melaço continha apenas monossacarídeos e que a quantidade de sacarose (açúcar não redutor) era irrisória ou ausente.

A medida do Brix indica o conteúdo de sólidos solúveis e é uma indicação indireta do conteúdo de açúcares. Os valores de Brix corroboram as medidas de açúcar total, sendo que L1, que continha maior concentração de açúcar total, também apresentou maior valor Brix.

Tabela 1. Composição química dos lotes de melaço de cana de açúcar.

Medidas	Melaço L1*	Melaço L2*
Proteínas (mg/mL)	0,15	-
Açúcar redutor (g/g)	0,11	0,2
Açúcar total (g/g)	0,3	0,2
BRIX (%)	85	65
pH	5,28	5,5

*Identificação: (L1) Usina Biorigin Zilor, Quatá/SP, 19780-000. (L2) Usina São Martinho, Pradópolis/SP.

Dessa forma, nos experimentos com melaço a 50 g/L, foram adicionados 15 g/L e 10 g/L de açúcar total, nos meios de cultivo com melaço L1 e L2, respectivamente.

Tabela 2. Análise química melaço L2 realizada pela empresa Agrolab - Laboratório de Análises Agropecuárias Ltda.

Componente	(g/L)
Matéria orgânica	516,03
Carbono orgânica	299,32
Potássio (K₂O)	12,55
Fósforo (P₂O₅)	0,416
Nitrogênio (N)	2,33
Cálcio (CA)	0,183
Magnésio (Mg)	0,075
Enxofre (S)	0,917
Zinco (Zn)	0,0085
Ferro (Fe)	0,090
Sódio (Na)	0,128
Cobre (Cu)	0,001
Manganês (Mn)	0,006
Boro (B)	0,004

6.3 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR OU SACAROSE

Para avaliar a velocidade de crescimento, a cepa de *Rhizopus* sp foi inoculada em placas de Petri em meio sólido contendo sais de Vogel, com sacarose ou com melaço de cana de açúcar, com as concentrações 1, 5 e 10 g/L. O halo de crescimento foi medido com régua (em cm) a cada 6 h, até que o micélio alcançasse a área total da placa. Para comparação e controle do experimento, foi inoculado simultaneamente, uma cepa de *Fusarium* sp, mantida nas condições. Nos cultivos de *Rhizopus* sp em sacarose (Figura 7), o melhor resultado foi obtido com 10g/L, verificando-se preenchimento da área total da placa e esporulação em 36 h de crescimento. Por

outro lado, quando o melaço (Figura 7) foi utilizado como fonte de carbono, o crescimento foi mais rápido, sendo o tempo para preenchimento da área total da placa de 30 h (6 horas a menos do que com sacarose), mesmo na menor concentração de melaço (1g/L) (Figura 6). O crescimento do halo micelial de *Fusarium* sp está registrado na Figura 8. As medidas da produtividade foram registradas por imagem e os resultados estão apresentados nas Figuras 9 (crescimento com sacarose) e 10 (crescimento com melaço).

Figura 6: Crescimento de *Rhizopus* sp em meio sólido de melaço a 1 g/L e sais de Vogel, preenchendo a placa com 36 h de cultivo. Aquisição em lupa Biotika com aumento de 7 vezes.



Fonte: Autor, 2025

Os registros de variação de temperatura nos experimentos de crescimento em meio sólido (temperatura mínima e máxima, respectivamente) foram $26 \pm 0,5$ a 35 ± 0 °C, em sacarose e $24 \pm 1,4$ a $28 \pm 3,3$ °C em melaço.

Figura 7: Média de crescimento do halo micelial em centímetros de *Rhizopus* sp em meio sólido de sacarose e melaço a 1, 5, 10 g/L e sais de Vogel.

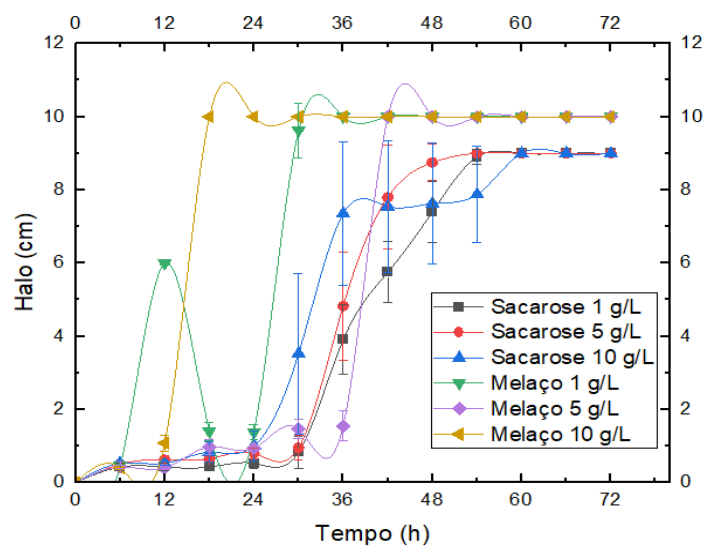


Figura 8: Média de crescimento do halo micelial em centímetros de *Fusarium* sp. sp em meio sólido de sacarose e melaço a 1, 5, 10 g/L e sais de Vogel.

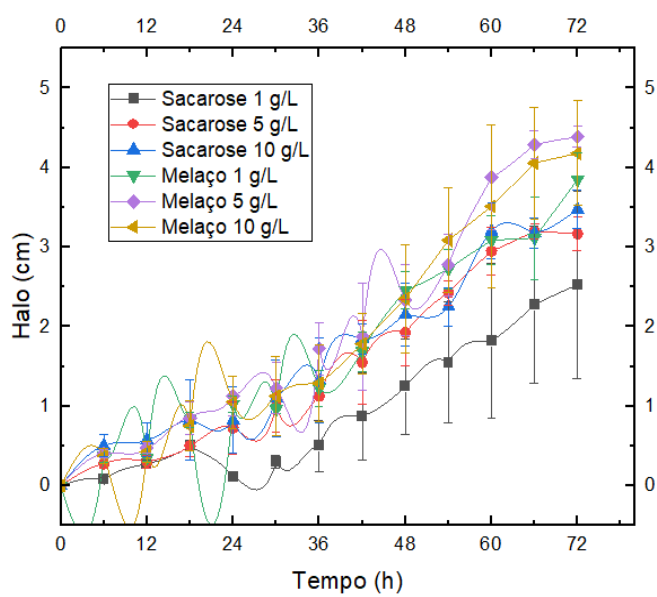
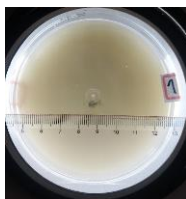
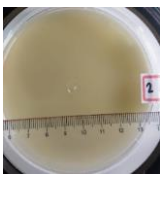
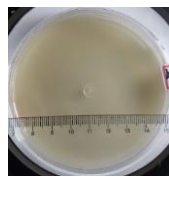
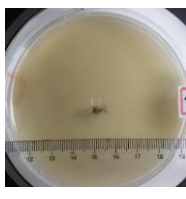
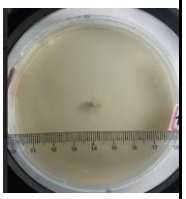
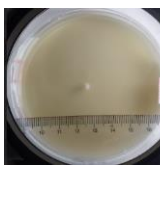
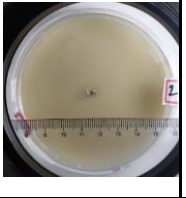
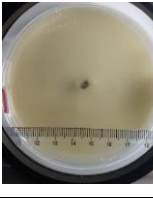
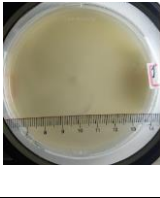
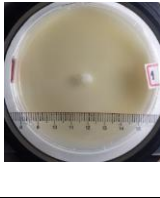
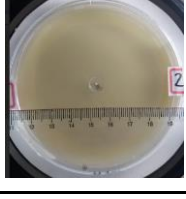
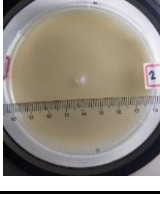
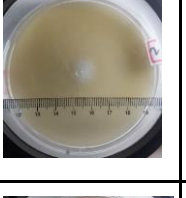
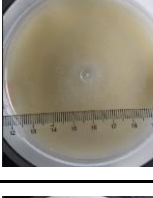
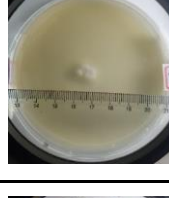
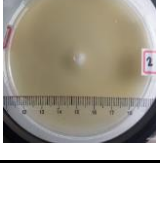
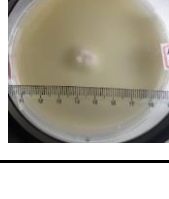


Figura 9: Registros fotográficos do crescimento de *Rhizopus* sp LBBIO-01 e *Fusarium* sp LBBIO-03 em meio de cultivo sólido contendo sais de Vogel e sacarose. Foram realizadas quadruplicatas para cada concentração de açúcares, tanto em melaço, quanto em sacarose.

Fungos	<i>Rhizopus</i> sp			<i>Fusarium</i> sp		
Sacarose	1 g/L	5 g/L	10 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L
Tempo (h)						
6						
12						
18						
24						
30						
36						

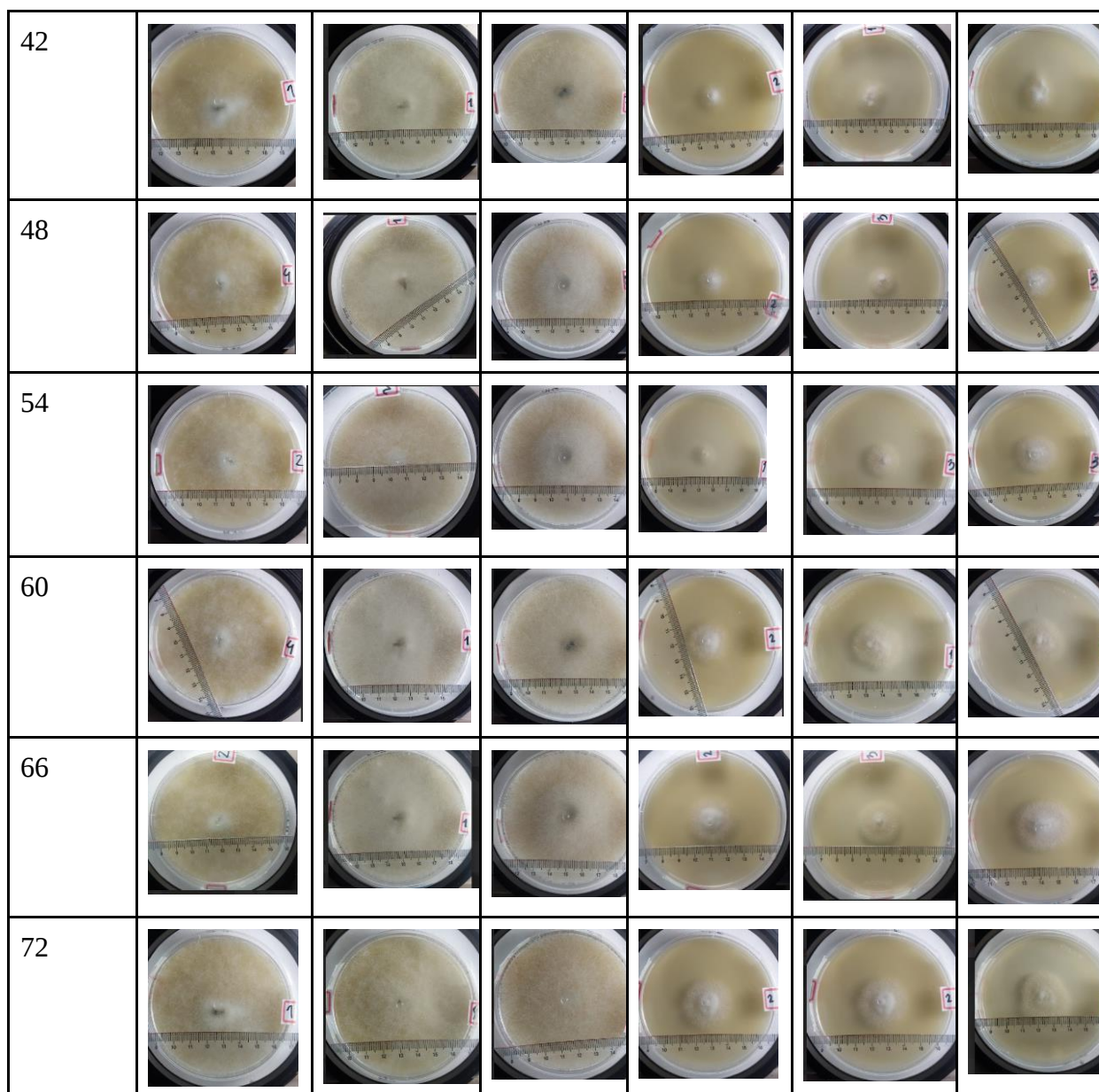
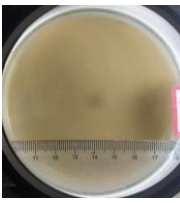
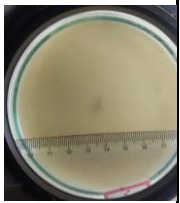
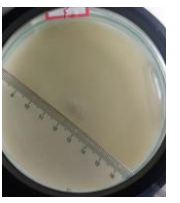
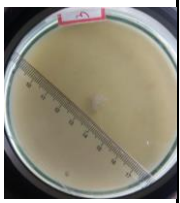
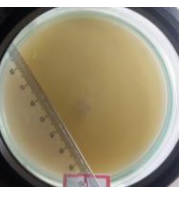
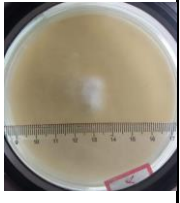
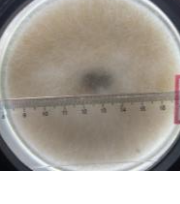
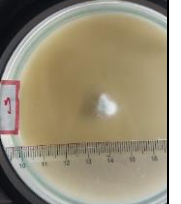
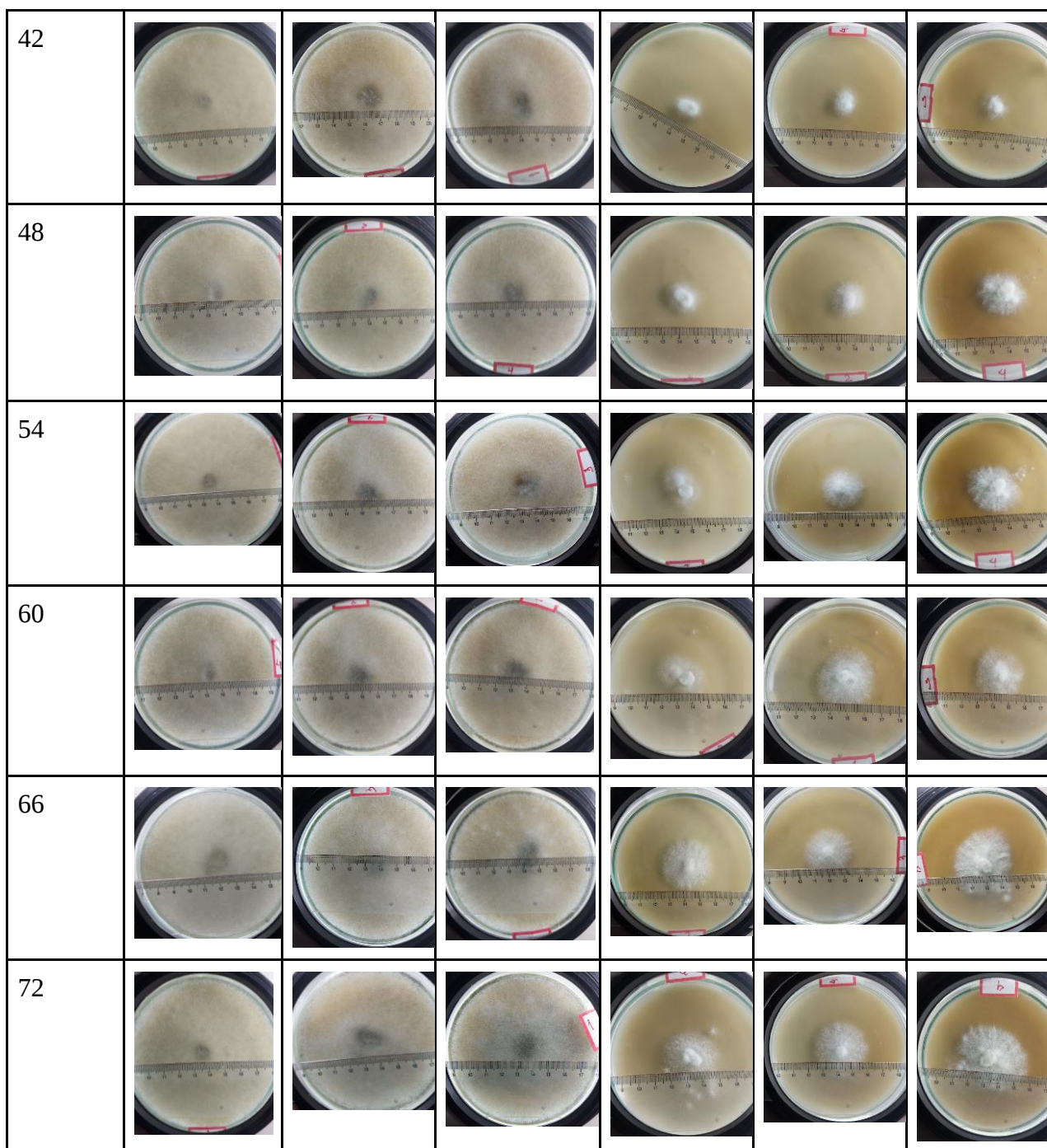


Figura 10: Registros fotográficos do crescimento de *Rhizopus* sp em meio de cultivo sólido contendo sais de Vogel e melaço.

Tempo (horas)	<i>Rhizopus</i> sp			<i>Fusarium</i> sp		
Melaço	1 g/L	5 g/L	10 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L
6						
12						
18						
24						
30						
36						



A determinação da velocidade específica de crescimento (μ (cm/h)) (Tabela 3) demonstrou, em primeira análise, a expressiva velocidade de crescimento do gênero *Rhizopus*, obtendo-se valores de medida de halo de crescimento 10 a 13 vezes superiores às medidas realizadas com *Fusarium* sp.

Além disso, comparando-se a velocidade de crescimento micelial de *Rhizopus* sp em cultivos com melaço ou sacarose, destaca-se o fato de que os experimentos com melaço

proporcionaram valores superiores de μ (cm/h), em todas as concentrações utilizadas. Observou-se valores de μ (cm/h) quase 3 vezes maior com melaço do que com sacarose, considerando a concentração de 1 g/L. Apesar do melaço ser mais favorável ao crescimento do que a sacarose, o aumento da concentração de melaço não proporcionou resultados crescentes de μ .

Tabela 3: Velocidade específica de crescimento μ (cm/h) na fase exponencial

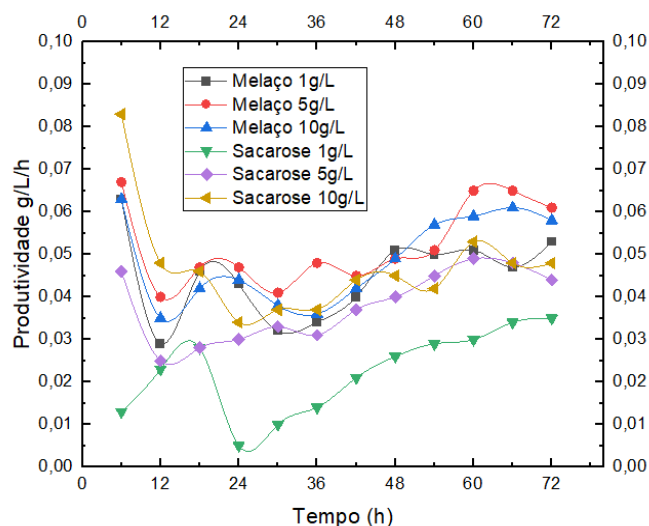
Microrganismos	μ (cm/h)					
	<i>Rhizopus</i> sp			<i>Fusarium</i> sp		
Concentração fonte carbono (g/L)	1	5	10	1	5	10
Sacarose	0,33	0,57	0,53	0,05	0,06	0,05
Melaço	0,90	0,93	0,73	0,05	0,05	0,07
Melaço μ / Sacarose μ	2,7	1,6	1,4	1,0	0,8	1,4

O efeito favorável do melaço no crescimento do *Rhizopus* sp não se repetiu no experimento com *Fusarium* sp, não sendo obtidos resultados melhores do que com sacarose. Esse resultado demonstra que a utilização desse subproduto agroindustrial como meio de cultura, embora contenha nutrientes necessários para o desenvolvimento de microrganismos, precisa ser estudada individualmente para cada gênero.

Outros autores também obtiveram bons resultados no cultivo de fungos com melaço como meio de cultivo. Nafady *et al.* (2016) cultivaram *Fusarium camptoceras* em melaço para produção de β -carotenos e apresentaram resultados satisfatórios obtendo-se produção de β -carotenos em aproximadamente 30 mg/L com concentração de melaço a 5 g/L. Neste estudo, a biomassa seca também foi quantitativamente maior no crescimento em melaço com aproximadamente 15 g/L, quando comparado aos outros meios comprovando o melaço como ótima fonte de carbono para o crescimento de biomassa e síntese da molécula.

O trabalho de Lima *et al.* (2017) utilizou melaço como fonte de carbono no crescimento dos fungos da ordem Mucorales *Mucor subtilissimus*, *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus*

Figura 12: Produtividade do crescimento micelial de *Fusarium* sp LBBIO-03 em meio sólido contendo sais mínimos de Vogel, sacarose ou melaço de caldo de cana de açúcar.



Os testes de crescimento do fungo *Rhizopus* sp LBBIO-01 em meio sólido contendo melaço permitiram concluir que o melaço de cana de açúcar pode ser utilizado como componente de meio de cultivo para esta cepa, proporcionando claramente vantagem em relação à sacarose. Esse resultado é de grande importância, pois o melaço tem custo financeiro muito menor em relação a sacarose e representa subproduto agroindustrial.

Calculando-se a velocidade específica de crescimento, os maiores valores foram obtidos com melaço a 1 e 5 g/L. Avaliando-se a produtividade, por outro lado, o maior valor foi obtido com melaço a 10 g/L. Considerando que o fator tempo de fermentação/crescimento/produção costuma ser preponderante nos processos industriais, concluiu-se neste experimento que o melaço a 10 g/L foi a condição mais interessante, por proporcionar crescimento no menor tempo.

6.4. OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COMPARANDO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO

6.4.1 Determinação da biomassa

Tendo em vista que o objetivo deste trabalho é obtenção de biomassa fúngica, os cultivos com melaço apresentaram resultados superiores aos verificados com sacarose (Figura

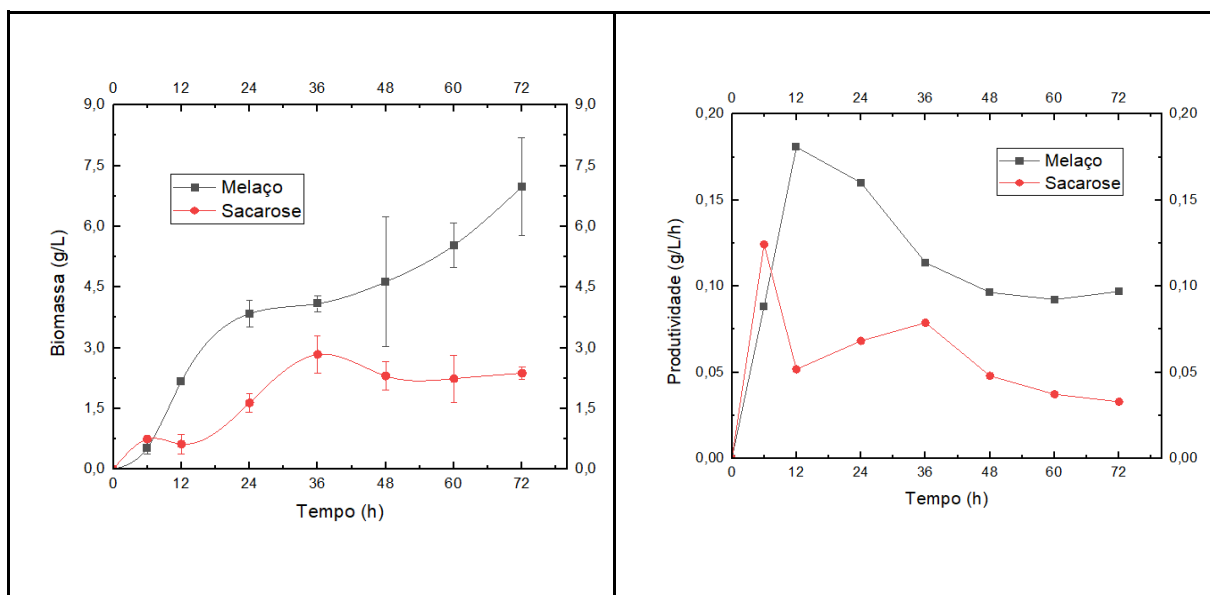
13-A). Obteve-se máximo de biomassa de 5,5 g/L em 60 h de cultivo utilizando melaço (L1), enquanto com sacarose o máximo foi 2,8 g/L em 36 h. Nos cultivos com melaço, a fase exponencial de crescimento foi observada até 24 h de cultivo, com velocidade específica de crescimento de $0,177 \text{ g/Lh}^{-1}$. Utilizando sacarose, observou-se fase exponencial até 36 h e velocidade específica de crescimento de $0,092 \text{ g/Lh}^{-1}$. Os maiores valores de produtividade foram obtidos nas primeiras 12 h de cultivo (Figura 13-B), sendo que os cultivos com melaço apresentaram valores aproximadamente 3 vezes superiores aos com sacarose.

Calculando-se o rendimento utilizando o teor de açúcar total (15 g/L) no melaço L1 adicionado no experimento, obtém-se 0,36 g biomassa/g açúcar. Experimentos com sacarose resultaram em rendimento 6 vezes menor (0,056 g biomassa/g açúcar).

Figura 13. Crescimento celular em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Biomassa determinada por gravimetria. Produtividade calculada pela relação entre biomassa (g/L) / tempo de cultivo (h).

A

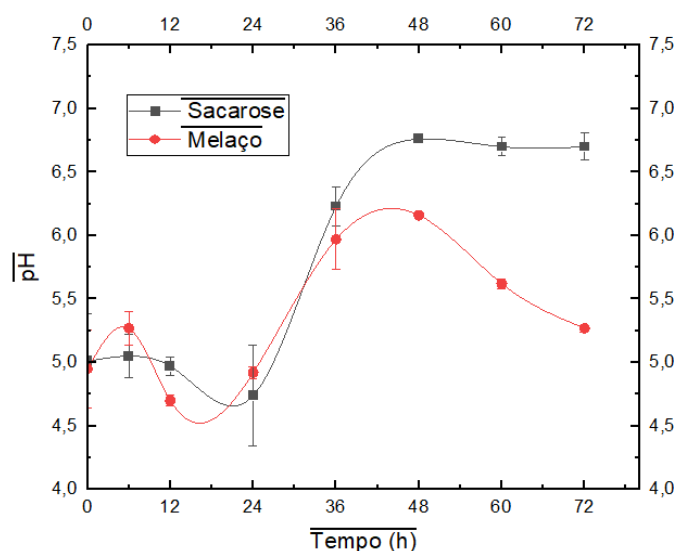
B



6.4.2 Determinação de pH

Os cultivos foram acompanhados de medida de pH, após a remoção do micélio por filtração (Figura 14). Nas primeiras 36 h de cultivo, os valores de pH permaneceram próximos a pH 5, tanto em meios de cultura contendo melaço, quanto contendo sacarose. Após 36 h de incubação, os cultivos com sacarose apresentaram valores de pH próximos à neutralidade, enquanto aqueles com melaço mantiveram-se abaixo de pH 6.

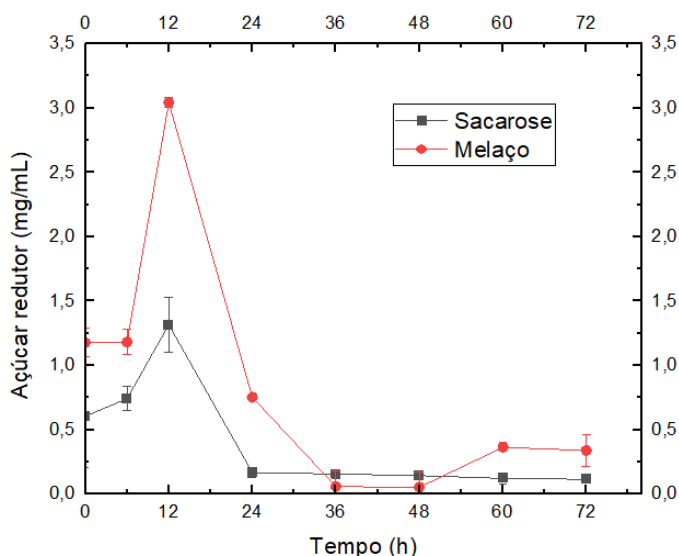
Figura 14. Determinação de pH em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio contendo sais mínimos de Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Determinação de pH utilizando pHmetro.



6.4.3 Determinação de açúcar redutor

A medida de açúcar redutor foi realizada pelo método de DNS no sobrenadante de cultura após remoção das células por centrifugação (Figura 15). Observou-se um aumento no teor de açúcar redutor nas primeiras 6 h de cultivo, tanto em meio contendo sacarose, quanto melaço, indicando que o conteúdo de sacarose (dissacarídeo não redutor) foi hidrolisado a monossacarídeos redutores. Entre 6 e 24 h de cultivo, ocorreu consumo quase total do açúcar redutor. A exaustão de carboidratos coincide com o início da fase estacionária de crescimento (Figura 13-A), indicando que a falta de fonte de carbono limitou o crescimento dos microrganismos.

Figura 15. Determinação de açúcar redutor em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando sacarose (■) ou melaço (●) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio contendo sais mínimos de Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Determinação de açúcar redutor pelo método de DNS.



6.4.4 Determinação de proteínas

Foram realizadas determinações de proteínas pelo método de Bradford, com o intuito de verificar a excreção de proteínas para o meio de cultivo. Entretanto, o teor de proteína foi insuficiente para detecção pelo método. O meio de cultura utilizado neste trabalho foi composto dos sais de Vogel e contava apenas com fontes inorgânicas de nitrogênio, que não seriam detectadas pelo método de Bradford. Dessa forma, não foi quantificado o consumo de nitrogênio, nem detectada excreção de proteínas, seja em meio com melaço ou meio com sacarose. Logo, pode-se deduzir que também não houve liberação significativa de enzimas.

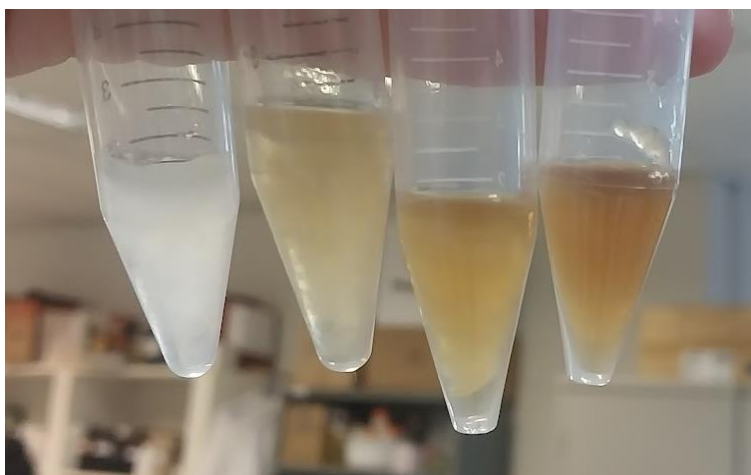
6.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp. LBBIO-01

Para realizar os experimentos em fermentação submersa, a cepa de *Rhizopus* sp foi inoculada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto de sais mínimos de Vogel, melaço (L1) 10, 25 ou 50 g/L, mantidos em agitação de 180 rpm a 30 °C, a cada 24 h por até 72 h. O micélio foi separado por filtração a vácuo e o filtrado foi utilizado para as análises.

6.5.1 Análise morfológica

A observação macroscópica dos cultivos permitiu visualizar que a adição do melaço obviamente confere coloração marrom tanto para o sobrenadante de cultivo quanto para o micélio (Figura 16). Por outro lado, a adição de sacarose ou melaço não alterou a morfologia do micélio, sendo observado micélio de aspecto disperso e não ocorreu a formação de agregados como *pellets*.

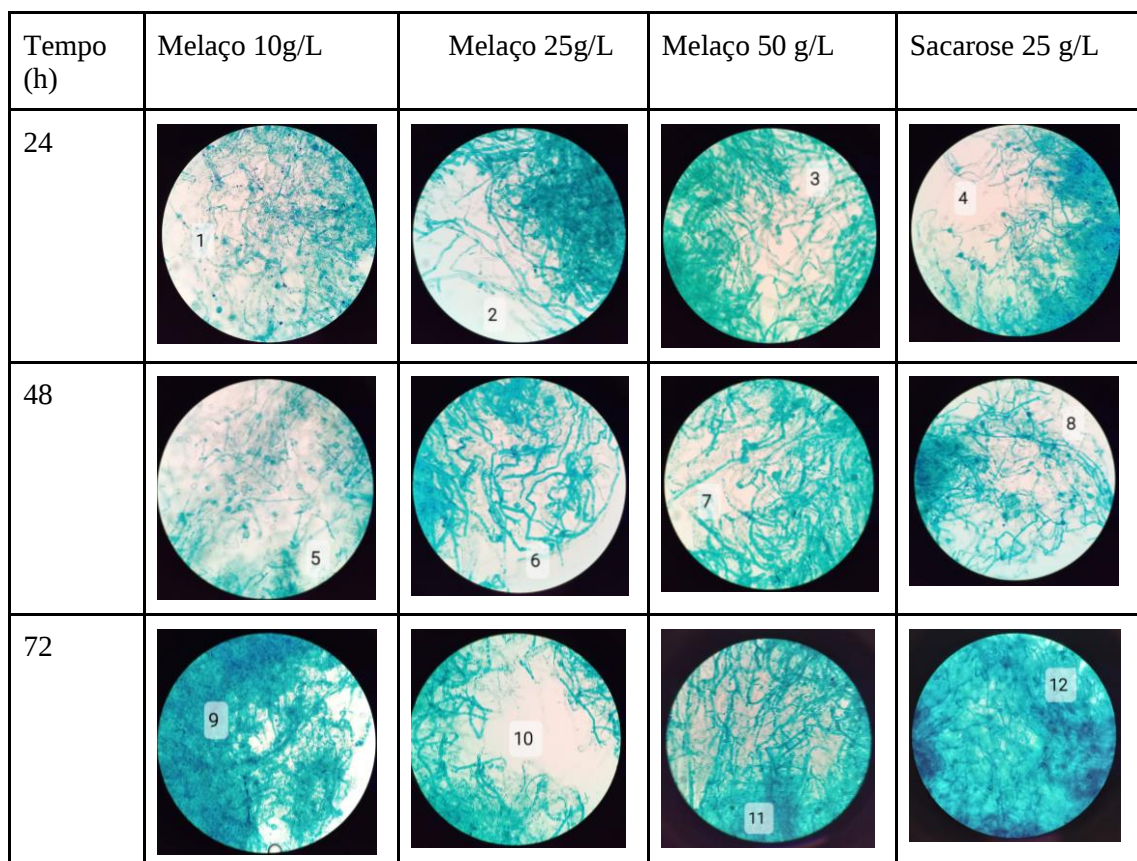
Figura 16: Amostra micelial de 25 g/L de sacarose, 10, 25 e 50 g/L de melaço respectivamente, coletadas em 24 horas de cultivo.



Fonte: Autor, 2025

Foram realizadas análises microscópicas, tanto de amostras de cultivos com melaço (10 a 50 g/L) quanto com sacarose (25 g/L) (Figura 17). A densidade de micélio nas amostras refletiu o crescimento celular em cada condição, ainda assim, o aspecto das hifas não apresentou diferenças a serem destacadas, com espessura de hifa sem variações e abundante formação de estruturas globulares de reprodução, os esporângios.

Figura 17 - Imagens microscópicas de micélio de *Rhizopus* sp LBBIO-01 em fermentação submersa. Cultivos em meio de cultura contendo sais mínimos de Vogel, melaço 10 a 50 g/L ou sacarose 25 g/L, agitação a 180 rpm, 30 °C, incubação por 24 a 72 h. Microscópio óptico Olympus CX21, aumento de 400 x, coloração com azul de lactofenol.



Fonte: Autor, 2025

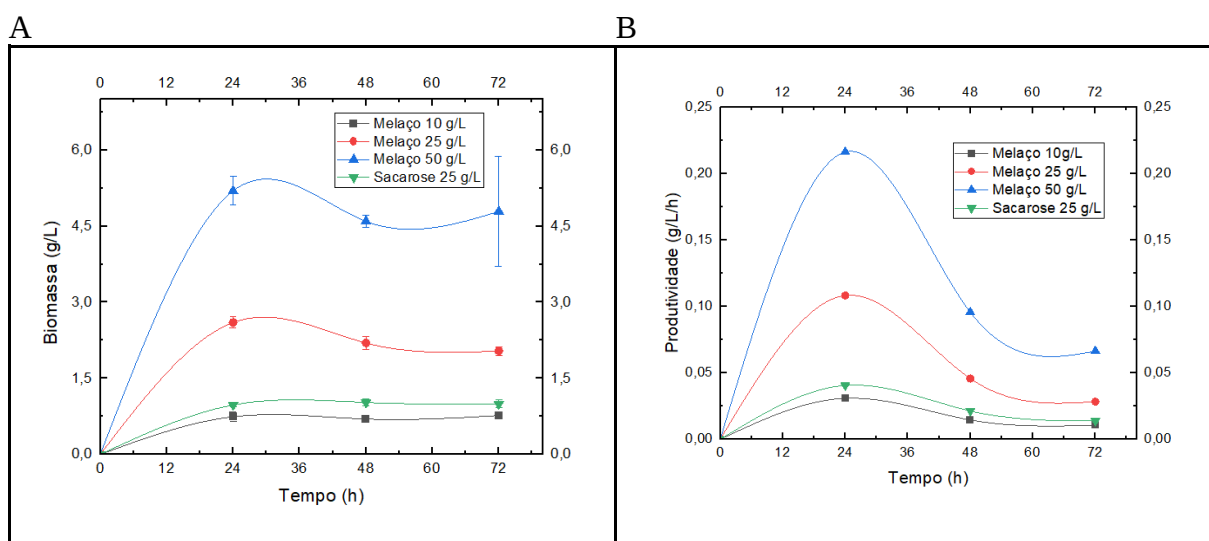
6.5.2 Determinação da biomassa

Observou-se que o melaço proporciona crescimento de biomassa superior à sacarose nas concentrações a partir de 25 g/L e que mesmo na menor concentração (10 g/L), os resultados são praticamente iguais à sacarose, reforçando a importância desse subproduto agroindustrial para obtenção de biomassa fúngica.

Obteve-se máximo de biomassa em torno de 5 g/L em 24 h de cultivo utilizando melaço à 50 g/L (Figura 18- A). Considerando o perfil de crescimento, em todas as concentrações de melaço, a fase exponencial de crescimento ocorreu nas primeiras 24 h de crescimento. Calculando-se a velocidade média de crescimento, obtém-se 0,039; 0,108; 0,216 g/Lh⁻¹ (para 10, 25 e 50 g/L de melaço, respectivamente), indicando que quanto maior a concentração de melaço, maior a velocidade de crescimento.

Os maiores valores de produtividade foram obtidos nas primeiras 24 h de cultivo, em todas as condições de cultivo (Figura 18-B), sendo que os cultivos com melaço 50 g/L apresentaram valores em torno de 7 vezes maiores do que cultivos com sacarose ou melaço 10 g/L. Calculando-se o rendimento da produção de biomassa (g biomassa/g açúcar) em 24 h de cultivo, obteve-se 0,0742 g/g; 0,26 g/g e 0,52 g/g em melaço a 10, 25 e 50 g/L, respectivamente. Em comparação, o rendimento com sacarose foi de 0,04 g/g, menor inclusive do que o encontrado nos experimentos com a menor adição de melaço (10 g/L).

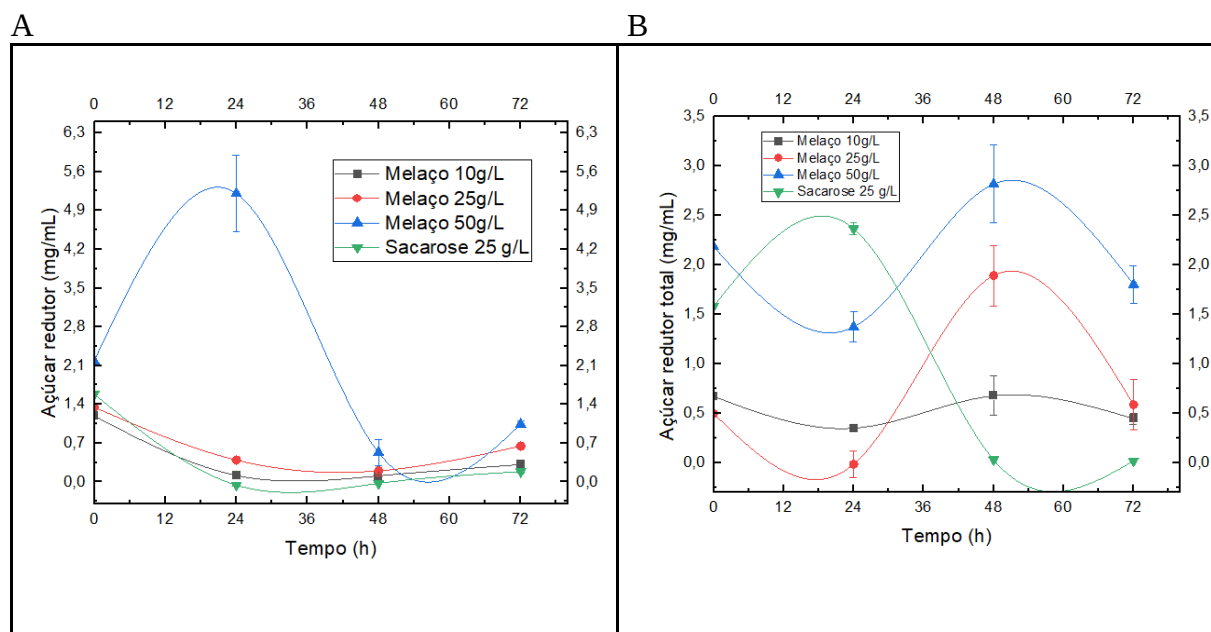
Figura 18. Determinação de crescimento celular em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio contendo sais mínimos de Vogel, 180 rpm, 30 °C. Biomassa determinada por gravimetria. Produtividade calculada pela relação entre biomassa (g/L) / tempo de cultivo (h).



6.5.3 Determinação de açúcar redutor e açúcar redutor total

A medida de açúcar redutor foi realizada pelo método do DNS, no sobrenadante de cultura após remoção das células por centrifugação. Observou-se um aumento no teor de açúcar redutor nas primeiras 6 h de cultivo, indicando que o conteúdo de sacarose (dissacarídeo não redutor) foi hidrolisado a monossacarídeos redutores. Entre 12 e 24 h de cultivo, ocorreu consumo quase total do açúcar redutor. A exaustão de carboidratos coincide com o início da fase estacionária de crescimento (Figura 13-A), indicando que a falta de fonte de carbono limitou o crescimento dos microrganismos. (Figura 19)

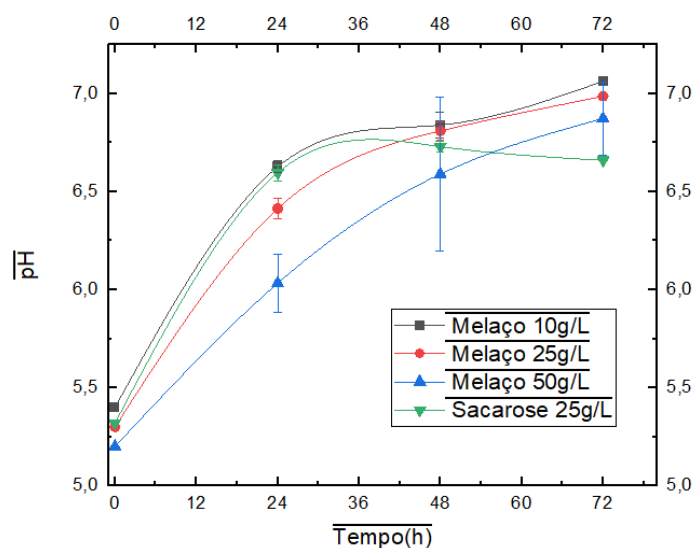
Figura 19. Determinação de açúcar redutor em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando melaço 10 g/L (■) ou melaço 25 g/L (●) melaço 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio Vogel, 180 rpm, 30 °C. Determinação de açúcar redutor pelo método de DNS.



6.5.4 Determinação de pH

Os cultivos foram acompanhados de medida de pH, após a remoção das células por filtração (Figura 20). Nas primeiras 6 horas de cultivo, os valores de pH permaneceram próximos a pH 5, tanto em meios de cultura contendo melaço, quanto contendo sacarose. Após 48 h de incubação, os cultivos com sacarose apresentaram valores de pH próximos à 6, enquanto aqueles com melaço apresentaram aumento de pH próximos à neutralidade.

Figura 20. Determinação de pH em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio contendo sais mínimos de Vogel, 180 rpm, 30 °C. Determinação de pH utilizando pHmetro.

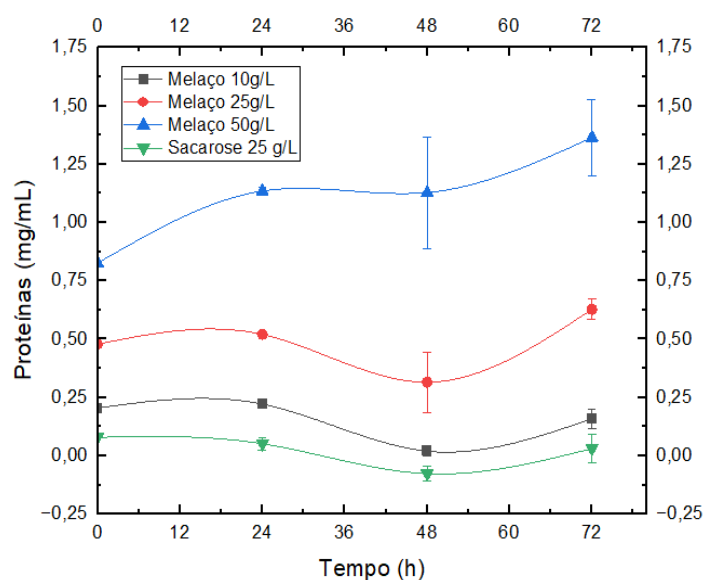


6.5.5 Determinação de proteínas

Foram realizadas determinações de proteínas pelo método de Bradford, com o intuito de verificar a excreção de proteínas para o meio de cultivo. Observou-se que em cultivos contendo melaço, principalmente a 50 g/L, a quantificação de no máximo 1,36 mg/mL até 72 h (Figura 21), enquanto para sacarose não houve quase nenhuma quantificação significativa desses polímeros registrados. A composição complexa do melaço pode justificar as proteínas presentes encontradas.

Considerando que a adição de melaço ao meio de cultivo proporcionou melhores resultados do que a sacarose em todos os parâmetros avaliados: maior quantidade de biomassa, maior velocidade de crescimento, maior produtividade e menor tempo de cultivo, decidiu-se a partir dessa etapa, selecionar melaço a 50 g/L como a fonte de carbono para os demais experimentos.

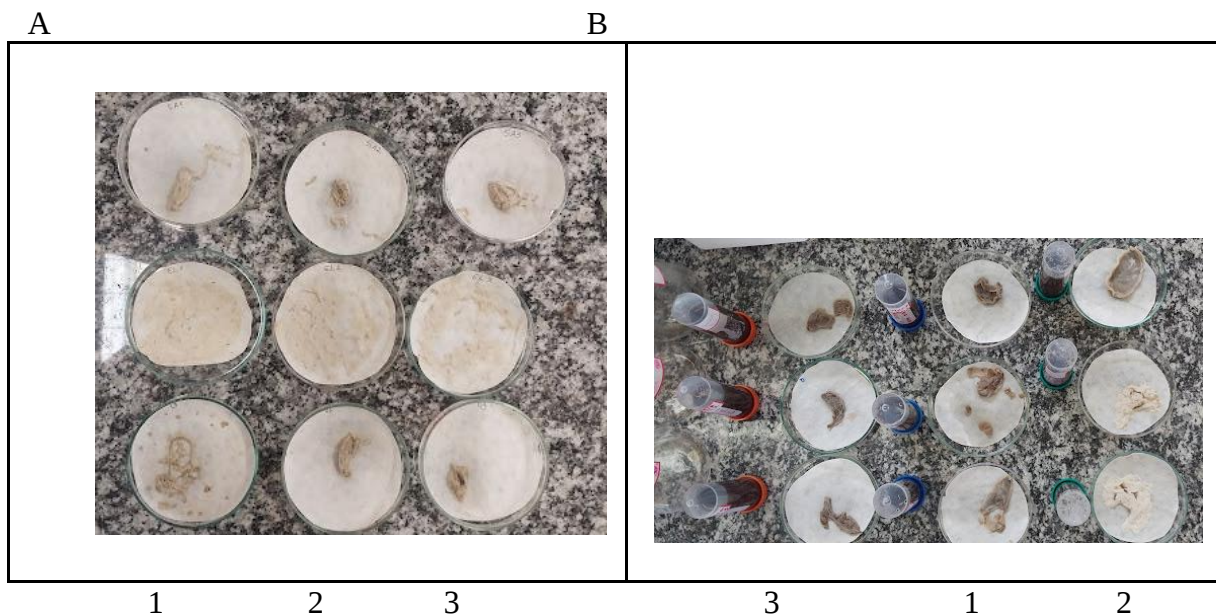
Figura 21. Determinação de proteínas em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando melaço 10 g/L (■), 25 g/L (●) ou 50 g/L (▲) e sacarose 25 g/L (▼) como fonte de carbono. Cultivos realizados em meio Vogel, 180 rpm, 30 °C. Determinação de proteínas utilizando o método de Bradford.



6.6 EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01

Logo após o crescimento, o conteúdo dos frascos foi filtrado à vácuo. A biomassa (Figura 22) foi quantificada por gravimetria e o sobrenadante foi utilizado para as demais análises. A observação macroscópica da biomassa indicou micélio disperso, sem a formação de *pellets* em todas as fontes de nitrogênio testadas.

Figura 22: (A) Biomassa recolhida em 24 h de cultivo: (1) sulfato de amônio, (2) extrato de levedura, (3) ureia. (B) Biomassa e caldo fermentado recolhidos em 48 h: (3) ureia, (1) sulfato de amônio e (3) extrato de levedura.



Fonte: Autor, 2025

6.6.1 Determinação de biomassa

As fontes de nitrogênio testadas proporcionaram ótimos resultados. Alcançou-se 8 g/L de biomassa com sulfato de amônio e extrato de levedura (Figura 23-A), ainda que com diferentes tempos de cultivo (48 h com extrato de levedura e 72 h com sulfato de amônio).

Utilizando-se sulfato de amônio, os cultivos não chegaram à fase estacionária de crescimento. Cultivos com ureia e nitrato de amônio alcançaram a fase estacionária com 24 h e os cultivos com extrato de levedura, com 48 h. Esses resultados indicam que a fonte de nitrogênio proporciona aumento na quantidade de biomassa, mas também interfere na velocidade de crescimento e produtividade.

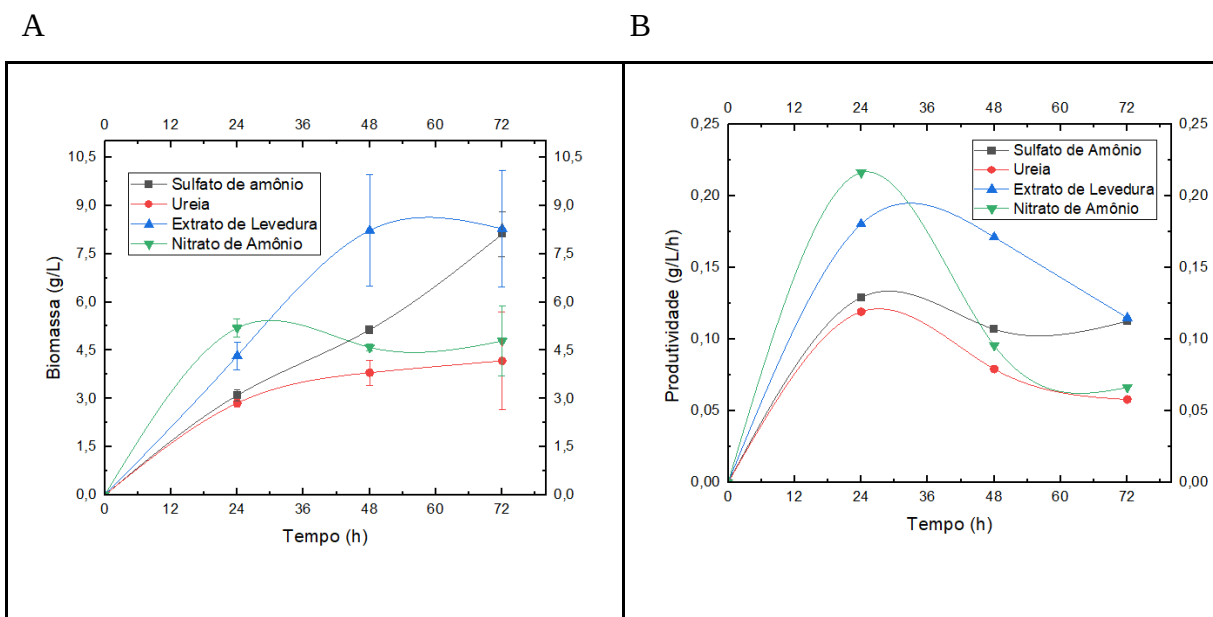
Foram calculados valores de velocidade média de crescimento, obtendo-se $0,21 \text{ g/Lh}^{-1}$; $0,17 \text{ g/Lh}^{-1}$; $0,12 \text{ g/Lh}^{-1}$ e $0,11 \text{ g/Lh}^{-1}$ para nitrato de amônio, extrato de levedura, ureia e sulfato de amônio, respectivamente.

Os maiores valores de produtividade foram obtidos nas primeiras 24 h de cultivo, com todas as fontes de nitrogênio utilizadas. Os cultivos com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio ($0,21 \text{ g/Lh}^{-1}$) foram os que apresentaram os maiores valores de produtividade entre todos os testes (Figura 23-B). Ainda que com extrato de levedura tenham sido alcançados os maiores valores em quantidade de biomassa (8 g/L), o tempo de cultivo foi de 48 h, resultando

em menor produtividade quando comparado às outras fontes de nitrogênio, em 24 h de cultivo. Cultivos com extrato de levedura e sulfato de amônio apresentaram o mesmo rendimento (0,8 g/g), enquanto com ureia e nitrato de amônio os valores foram menores (0,4 e 0,5 g/g, respectivamente).

Os resultados obtidos são importantes devido às características próprias que as fontes de nitrogênio conferem ao bioprocesso. As fontes inorgânicas de nitrogênio em geral têm menor custo, barateando o processo, além de apresentarem composição definida, facilitando etapas posteriores de separação e purificação. As fontes orgânicas, por sua vez, têm composição complexa e muitas vezes contribuem com outros nutrientes além do nitrogênio. O extrato de levedura, por exemplo, é utilizado como fonte de vitaminas. Entretanto, as fontes orgânicas de nitrogênio têm custo mais elevado em comparação às fontes inorgânicas e sua composição complexa geralmente aumenta o número de etapas de purificação. Os resultados obtidos indicam que ambas as fontes de nitrogênio podem ser utilizadas para produção de biomassa de *Rhizopus* sp, podendo ser selecionada aquela que for mais vantajosa para a aplicação biotecnológica requerida.

Figura 23. Crescimento celular em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando melaço como fonte de carbono e sulfato de amônio (■) ureia (●) extrato de levedura (▲) e nitrato de amônio (▼) como fonte de nitrogênio. Cultivos realizados em meio Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Biomassa determinada por gravimetria.



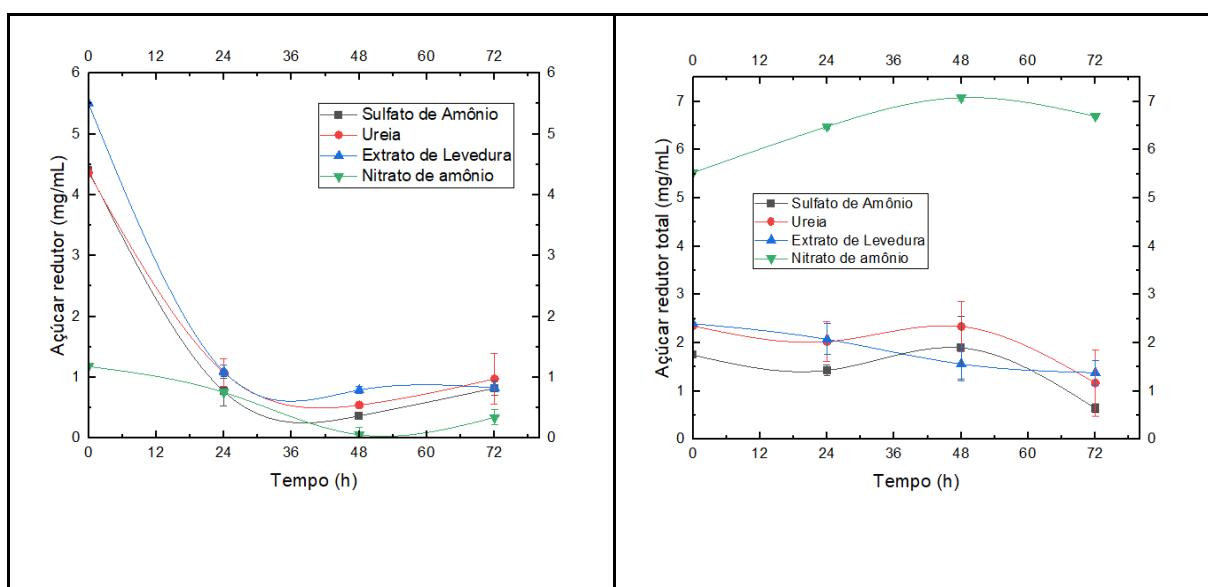
6.6.2 Determinação de açúcar redutor e açúcar redutor total

A medida de açúcar redutor foi realizada pelo método do DNS, no sobrenadante de cultura após remoção das células por centrifugação. As fontes de nitrogênio testadas não proporcionaram resultados diferentes em relação ao consumo de açúcar. O perfil de medidas de açúcar redutor (Figura 24-A) indicou exaustão desse nutriente após 24 h de cultivo, coincidindo com o início da fase estacionária para os cultivos com ureia e nitrato de amônio. As medidas de açúcar redutor total (Figura 24 -B) indicaram maior consumo nas primeiras 24 h. Mas de forma inesperada, como verificado em experimentos anteriores, ocorreu um aumento no carboidrato presente no sobrenadante de cultivo. O efeito parece se repetir e não ser um erro experimental. Posteriormente será investigada a secreção de oligossacarídeos e polissacarídeos por essa cepa.

Figura 24. Determinação de açúcar redutor em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-01 utilizando melaço como fonte de carbono e sulfato de amônio (■) ureia (●) extrato de levedura (▲) e nitrato de amônio (▼) como fonte de nitrogênio. Cultivos realizados em meio Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Determinação de açúcar redutor pelo método de DNS.

A

B

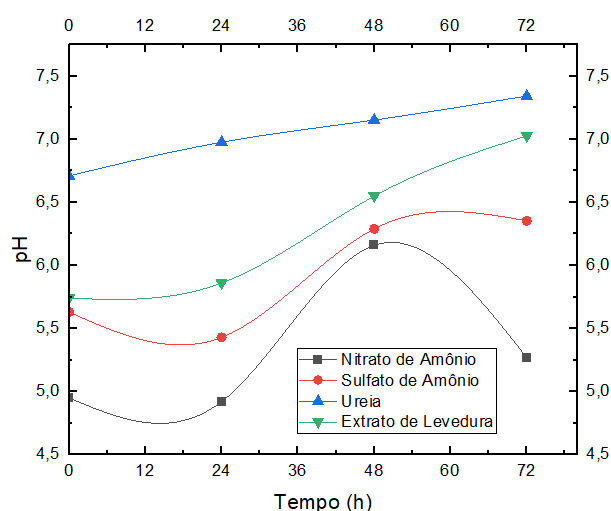


6.6.3 Determinação de pH

Os cultivos foram acompanhados de medida de pH, após a remoção das células por filtração (Figura 25). De maneira geral os cultivos apresentaram uma tendência a aumento de pH aproximando-se da neutralidade. Os cultivos com extrato de levedura e sulfato de amônio

iniciaram em pH entre 5,5 e 6, mas aumentaram rapidamente. Os cultivos com ureia mantiveram-se próximos da neutralidade.

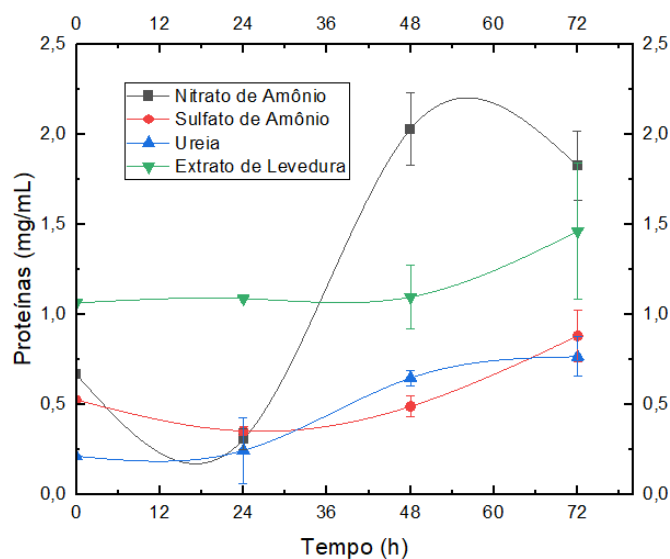
Figura 25. Determinação de pH em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando melaço como fonte de carbono e nitrato de amônio (■) sulfato de amônio (●) ureia (▲) e extrato de levedura (▼) como fonte de nitrogênio. Cultivos realizados em meio Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Determinação de pH utilizando pHmetro.



6.6.4 Determinação de proteínas

Os cultivos com maior detecção de proteínas foram aqueles realizados com extrato de levedura (Figura 26), que é composto por proteínas íntegras ou hidrolisadas, podendo ser detectadas pelo método de Bradford. Os demais meios de cultivo eram compostos de sais inorgânicos ou ureia, não sendo detectados pelo método. Estes apresentaram pequenos valores de proteínas, indicando que não ocorreu secreção significativa de proteínas. A resultados comparativos encontrados para nitrato de amônio nesse processo, conferem à composição e utilização do primeiro lote de melaço (L1).

Figura 26. Determinação de proteínas em cultivos de *Rhizopus* sp LBBIO-BL01 utilizando melaço como fonte de carbono e nitrato de amônio (■) sulfato de amônio (●) ureia (▲) e extrato de levedura (▼) como fonte de nitrogênio. Cultivos realizados em meio Vogel, fonte de carbono a 50 g/L, 180 rpm, 30 °C. Determinação de proteínas pelo método de Bradford.



Considerando os resultados obtidos até esta etapa do trabalho, selecionou-se o nitrato de amônio, da formulação original do meio Vogel, como fonte de nitrogênio para a continuidade do trabalho devido a boa produção em quantidade de biomassa, maior produtividade em 24 horas de cultivo, se tratar de fonte inorgânica de baixo custo e composição definida.

6.7 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01 EM MELAÇO E SAIS DE VOGEL EM ESCALA AUMENTADA

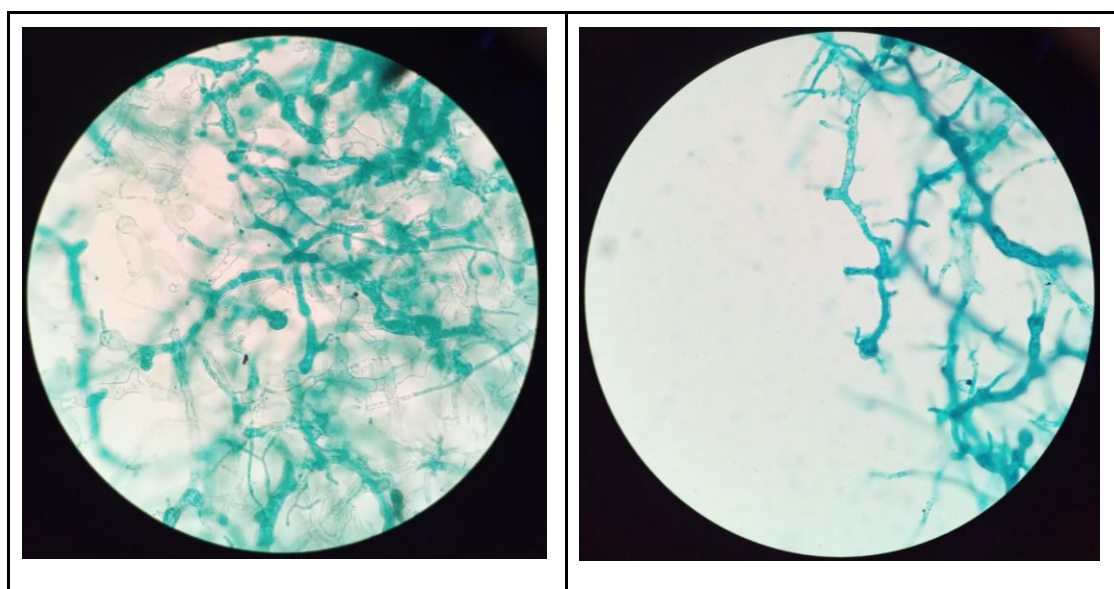
6.7.1 Análise morfológica

Para a inoculação do experimento foi utilizada suspensão de esporos com contagem na ordem de 10^8 esporos/mL. A morfologia dos esporos foi observada ao microscópio ótico, apresentando formato oval com diâmetros de 0,3 e 0,2 μm , nos sentidos longitudinal e transversal, respectivamente (Tabela 3).

Nos cultivos realizados em maior escala (frascos de 2000 mL), não foi observada mudança no aspecto macroscópico ou microscópico do micélio, em relação aos cultivos em frascos menores (250 mL). O aspecto macroscópico apresentou micélio disperso, sem

aglomerados como *pellets*. Ao microscópio óptico (Figura 27), foram observadas hifas espalhadas aleatoriamente, tanto nos frascos pequenos quanto nos maiores. As medidas de espessura de hifa revelaram medidas entre 2,8 e 15,3 μm (Tabela 4). Em algumas amostras, o interior da hifa apresentava separação visível entre a membrana e a parede celular. Nestes casos, a espessura entre membranas variou entre 2,3 e 13,6 μm , e o espaço entre membrana e parede celular variou entre 0,4 e 2,9 μm .

Figura 27: Imagens do micélio de *Rhizopus* sp cultivado em meio de sais mínimos de Vogel e melaço 50 g/L. Condições de análise: Microscópio ótico Olympus CX41, aumento de 40x, corante azul de lactofenol.



Fonte: Autor, 2025

Tabela 4- Análise morfológica do micélio e conídios de *Rhizopus* sp LBBIO-01. Condição de análise: Microscópio Leica modelo DmLS, Câmera Moticam 2300 3 M, aumento de 400 x. Cultivos em frascos de 2000 mL.

Medidas	Resultados
Espessura de hifa	$8,5 \pm 3,3 \mu\text{m}$
Espessura interna de hifa com parede celular visível	$7,4 \pm 3,3 \mu\text{m}$
Espaço entre membrana interna e parede celular	$2,0 \pm 0,85 \mu\text{m}$
Raio de corpos de frutificação	$7,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$
Dimensões de conídios em suspensão	$0,2 \times 0,3 \mu\text{m}$

6.7.2 Parâmetros de produção

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL e 2000 mL, cujas dimensões da base estão na tabela 5. Considerando os volumes de meio de cultura utilizados no experimento (50 mL e 200 mL, respectivamente), foi calculada a relação entre diâmetro da base do frasco e o volume de meio de cultura, visando comparar a interface com oxigênio que ocorreria nas duas situações experimentais. Esse fator é importante pois trata-se de microrganismo aeróbico, e a transferência de oxigênio é fator limitante para o crescimento. Verificou-se que nos frascos menores havia o dobro de interface em relação aos frascos maiores.

Ainda assim, a obtenção de biomassa de *Rhizopus* sp em frascos de diferentes dimensões não variou de forma importante. Considerando os valores médios de biomassa e o desvio padrão, pode-se assumir que ocorreu a mesma quantidade de biomassa e consequentemente a mesma produtividade, tanto em frascos menores quanto maiores. Nos frascos maiores, mesmo com menor interface para oxigenação, não houve prejuízo para o crescimento celular, indicando que a necessidade metabólica estava suprida e que novos testes, com volumes maiores de meio de cultura por frasco podem ser realizados, aumentando a produção por batelada.

Os resultados obtidos são importantes para fundamentar futuros experimentos de escalonamento da produção de biomassa por *Rhizopus* sp.

Tabela 5. Cultivo de *Rhizopus* sp LBBIO-01 em meio com sais mínimos de Vogel, melaço de cana de açúcar 50 g/L e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, em frascos de diferentes dimensões.

Medidas	Frascos de 250 mL	Frascos de 2000 mL
Diâmetro da base (cm)	8,7	17,4
Relação diâmetro/volume frascos	0,174	0,087
Biomassa (g/L)	4,8±1,0	4,80±0,37
Proteínas (ug/mL)	1,36±0,2	21± 5
Açúcar redutor (mg/mL)	0,2	0,53± 0,078
Açúcar total (mg/mL)	-	19 ±10
pH final	6	5,5

6.8 ANÁLISE QUÍMICA DA BIOMASSA *Rhizopus* sp LBBIO-01 OBTIDA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a análise da composição química da biomassa de *Rhizopus* sp, o microrganismo foi cultivado em frascos de 2000 mL contendo 200 mL de meio de cultivo, composto de sais mínimos de Vogel (incluindo nitrato de amônio) e melaço de cana de açúcar 50 g/L. Os cultivos foram realizados a 30 °C, 180 rpm, 72 h.

A biomassa de *Rhizopus* sp apresentou em torno de 34% de carbono orgânico e 4,5% de nitrogênio (Tabela 6).

Tabela 6. Análise química da biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 obtida em fermentação submersa com meio de cultura contendo sais mínimos de Vogel e melaço de cana de açúcar 50 g/L.

Análise	Resultados
Matéria seca (%)	95,73
Umidade (%)	4,27
Carbono orgânico (%)	34,26
Nitrogênio (%)	4,49

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

7.1 UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01

O objetivo desta etapa do presente trabalho era obter biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01, visando futuras aplicações biotecnológicas, como a extração de polissacarídeos miceliais. Para isso, buscou-se condições de cultivo de baixo custo para favorecer a exequibilidade da proposta. Dessa forma, a estratégia era comparar o crescimento da cepa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 em sacarose cristalizada e purificada, com o melaço, uma fonte complexa de sacarose e subproduto da indústria sucro-alcooleira.

O melaço tem sua produção valorizada no Brasil devido ao seu alto teor de açúcares, minerais e outros componentes que não foram cristalizados na produção de açúcar. Dentre a produção de açúcar e etanol, o melaço também pode fazer parte de diversos processos biotecnológicos, tais como a produção de proteínas, rações, levedura para panificação e antibióticos (OLIVEIRA *et al.* 2019).

Foram realizadas análises de caracterização do subproduto, melaço, utilizado no crescimento microbiano. Ao longo do trabalho foram utilizados dois lotes de melaço - L1 e L2. Os resultados demonstraram que uma das principais diferenças entre os dois lotes seria a concentração de sólidos solúveis, onde L1 apresentou BRIX a 80% e L2 BRIX a 65%. Esses valores podem ser facilmente correlacionados às menores concentrações de açúcares encontrados nas primeiras horas do cultivo em diferentes fontes de nitrogênio, experimento o qual o L2 foi utilizado.

O subproduto melaço é amplamente utilizado na fermentação de microrganismos como mostram trabalhos de Feltrini *et al.* (2006), Li *et al.* (2023) e Jaimes (2013).

Para a utilização do melaço na fermentação com bactérias lácticas no experimento de Feltrini *et al.* (2006), os pesquisadores realizaram análise físico-química do substrato onde foi relatado sua alta concentração em açúcares, cerca de 14,72% p/p para glicídios redutores em glicose, 33,78% p/p para glicídios não redutores em sacarose, assim como presença de minerais, como 0,015% p/v para fósforo, 1,63% p/v para potássio e 0,58% p/v para nitrogênio. Já no estudo de Li *et al.* (2023), o melaço com composição de açúcar total a 37,77%, açúcar redutor a 8,55% e proteínas a 13,25%, foi utilizado na fermentação de *Bacillus* sp visando a produção de tetrametilpirazina (TTMP), substância ativa utilizada para tratamento de doenças

cardiovasculares. Segundo os pesquisadores, o melaço é uma ótima fonte de carbono para crescimento microbiano além de ter um custo reduzido, porém ressaltam a averiguação na composição do subproduto uma vez que este, além de conter altos níveis de açúcares e outros componentes essenciais benéficos na fermentação, pode conter também cinzas e íons metálicos, o que poderia interferir no crescimento a longo prazo. O estudo em questão mostra as diferenças de síntese da substância após utilização de melaço tratado e não tratado em cinco diferentes tratamentos, onde, o tratamento com ferrocianeto de potássio apresentou melhores resultados com rendimento de 208,8 mg/L de TTMP.

Para Feltrini *et al.* (2006), não houve tratamento para remoção das cinzas à 9,98% p/p, porém foi adicionado ao meio concentrações de nitrogênio inorgânico e extrato de levedura. Os pesquisadores destacam preferência às fontes inorgânicas pela pureza, mesmo o extrato de levedura apresentando alta concentração de vitaminas do complexo B, excelentes estimuladores de crescimento para *Lactobacillus plantarum* (FELTRINI *et al.* 2006). Para este experimento, o melaço diluído à 3% enriquecido com 0,5% de citrato de amônio, 0,5% de acetato de sódio, 0,5% de fosfato de amônio, 0,2% de citrato de amônio, 0,1% de Tween 80 e 0,005% de sulfato de manganês apresentou melhores resultados na obtenção de biomassa com 2,01 g/L quase equivalente ao meio MRS controle, com 2,22 g/L.

O estudo de Jaimes (2013), teve objetivo de produzir ácido láctico a partir da fermentação do melaço de cana de açúcar com as bactérias *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*, obtendo-se concentrações de 50,22 g/L, 15,84 g/L e 50,59 g/L de ácido láctico, respectivamente. Para isso, inicialmente, foram registrados resultados das análises quantitativas do melaço, correspondendo a 61,04% de açúcares totais, onde 54,50% era sacarose, 3,46% glicose e 3,08% frutose. Do mesmo modo, foi obtida produtividade máxima em fermentação de *Lactobacillus plantarum* com 2,86 g/L.h. Visto isso, o autor caracteriza o melaço como boa fonte de carbono na fermentação visando produção de composto de interesse.

O trabalho de Yu *et al.* (2024) analisou a viabilidade da produção do polissacarídeo de *Tremella fuciformis* (TFPS) a partir da fermentação em melaço de cana de açúcar, o que revelou um potencial considerável como substituto sustentável e econômico da glicose na fermentação. A complexidade do melaço sugere a necessidade de ajustes nas condições de fermentação para otimizar a produção de polissacarídeos fúngicos.

A cepa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 do presente estudo foi utilizada para obtenção de biomassa em outros trabalhos do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UNESP-Campus Assis. Silva *et al.* (2023) estudaram o cultivo deste microrganismo em soro de leite.

Os autores obtiveram em torno de 8 g/L de biomassa em 30 h de cultivo, o que se aproxima dos valores do presente estudo (7 g/L em 60 h) de cultivo. Uma diferença marcante, entre o estudo de Silva *et al.* (2023) e o presente estudo, é a ampla disponibilidade de nitrogênio orgânico no soro de leite em contraposição à ausência desse componente no meio de Vogel. Esse é um fator que pode ter contribuído para o menor tempo de crescimento do microrganismo em soro de leite.

Em relação ao teor de açúcar redutor inicial, em ambos os meios (o do presente estudo e o soro de leite, Silva *et al.* 2023), os cultivos foram realizados com valor inicial em torno de 0,5 a 1 g/L de açúcar redutor. E em ambos os casos, ocorreu quase a exaustão desse componente em torno de 24h de cultivo. No caso dos cultivos de soro de leite (SILVA *et al.* 2023), foi verificado que o microrganismo não era capaz de metabolizar lactose. Matei *et al.* (2017) relatou a produção de invertase (enzima que hidrolisa a ligação glicosídica da sacarose, liberando glicose e frutose) por *Rhizopus stolonifer*, além de outros fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, indicando ser provável que a cepa de *Rhizopus* sp LBBIO-BL02 possa consumir sacarose. Estudos posteriores serão realizados para confirmar e quantificar a capacidade de secreção de invertase e a metabolização de sacarose pela cepa de *Rhizopus* sp LBBIO-01.

Considerando a utilização de resíduo agroindustrial para a obtenção de biomassa, o presente estudo apresentou resultados bastante satisfatórios, uma vez que foram obtidos valores de biomassa 3 vezes maiores com melaço do que com sacarose.

A concentração de açúcares presentes em 72 h tanto em sacarose quanto em melaço indica que ao cessar da fase exponencial, os açúcares hidrolisados em excesso não são mais consumidos pelo metabolismo do microrganismo que já se encontra na fase estacionária de desenvolvimento.

A maior produtividade é encontrada entre 6, 12 e 24 h de todos os cultivos relacionada às fases exponenciais de desenvolvimento microbiano, que cessam juntamente com a disponibilidade de açúcares redutores. Em cultivos com sacarose essa distinção das fases de desenvolvimento e presença de açúcares são mais acentuadas.

Visando redução de custo para a viabilidade de um bioprocessos, a utilização de subprodutos está associada aos conceitos de Ecologia e Sustentabilidade Industrial, onde se tem interesse principal em evitar a poluição ambiental, minimizando o descarte na natureza, em contrapartida, reduzindo a busca por matérias primas quando o subproduto de um processo é reutilizado como matéria prima em outro (BUENO, 2016).

O acúmulo e descarte de resíduos advindos dos sistemas de produção, principalmente de resíduos tóxicos, geram grande influência sobre o meio ambiente e sobre a qualidade de vida das pessoas. A expressão “Produção mais limpa” foi lançada em 1989, pela United Nations Environment Program (Unep) e Division of Technology, Industry and Environment (DTIE), e envolve a adoção contínua de uma abordagem integrada de produção ecológica em processos, produtos e serviços, com o objetivo de aprimorar a eficiência produtiva e diminuir os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente (BUENO, 2016). Neste contexto, pode se considerar que a reutilização de melaço no processo fermentativo, estaria corroborando com estas condições, tornando o método de produção sustentável.

7.2 EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01

Se tratando de fontes de nitrogênio para os microrganismos, o estudo de Pereira e Lemos (2004) levantou informações a respeito do seu uso no metabolismo nas espécies de fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum* na biorremediação. A escolha da fonte de nitrogênio é fundamental já que o nitrogênio está intrinsecamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos. Segundo os pesquisadores, para cada 100 unidades de carbono degradado, em média, são necessárias de 3 a 4 unidades de nitrogênio.

Há uma grande variedade na utilização de fontes de nitrogênio pelos microrganismos, sendo o extrato de levedura uma fonte eficaz de estímulo para seu crescimento pois fornece aminoácidos e vitaminas essenciais. Porém seu alto custo impacta negativamente na sua utilização, e o torna, muitas vezes, inviável economicamente aos processos industriais aos quais participa (PEREIRA e LEMOS, 2004). Visto isso, buscam-se alternativas mais econômicas para serem utilizadas em indústrias, como as fontes inorgânicas de nitrogênio. A amônia é facilmente assimilada, mas alguns microrganismos que possuem enzimas como nitrato redutase e nitrito redutase podem também assimilar nitrato e nitrito, respectivamente, convertendo-os em amônia (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Zhang *et al.* (2015) avaliaram a morfologia de *Rhizopus oryzae* em fermentação submersa para produção de ácido fumárico. Os autores observaram tanto micélio disperso, como no presente trabalho, quanto a formação de agregados como *pellets*, dependendo do pH do cultivo e da fonte de nitrogênio utilizada. Ao contrário do que foi observado no presente

estudo, com Zhang *et al.* (2015), a fonte de nitrogênio influenciou na morfologia do micélio. Neste estudo, aglomerados de micélios uniformemente dispersos ou agregados soltos de hifas foram produzidos com hidrolisado de soja como fonte de nitrogênio, enquanto *pellets* compactos com tamanhos variados foram formados com ureia ou extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

A fim de estabelecer relação comparativa entre a concentração de nitrogênio orgânico e inorgânico em meios de cultura, levanta-se os experimentos de Bueno (2016), onde realizou-se ensaios submersos com cultivos contendo extrato de levedura a 20 g/L e sais mínimos de Vogel (SMV), resultando em crescimento celular de 4,3 g/L e produção de 0,93 g/L de exopolissacarídeos (EPS), resultados estes, não satisfatórios uma vez que foram inferiores à cultivos apenas com biomassa de *L. theobromae* como fonte de carbono e nitrogênio orgânico. Neste contexto, conclui-se que as moléculas de nitrogênio orgânicos, disponibilizadas pelo metabolismo do próprio microrganismo do estudo em questão, são suficientes para produção do biocomposto de interesse. Apesar do custo pouco viável da utilização do extrato de levedura para crescimentos fermentativos de microrganismos, sua comercialização foca no seu alto teor de enzimas, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos e lipídios (BUENO, 2016).

Por sua vez, neste experimento, a adição de fontes de nitrogênio inorgânicas estabeleceu altos índices de crescimento celular, visto que, obteve-se fase exponencial de crescimento mais prolongada, sugerindo quantificação de biomassa maior em maior período de fermentação, ao contrário do crescimento em extrato de levedura que alcançou fase estacionária após 48 h de cultivo.

No estudo de Bueno (2016), as análises da biomassa micelial de *L. theobromae* mostraram concentração de 33% de proteína bruta, o que representa o nitrogênio proteico e compostos nitrogenados não-proteicos, tais como aminas, amidas, nitrilas e aminoácidos. A pesquisadora em questão, pontua que a riqueza nutricional da biomassa micelial poderia ser equiparada a da levedura *Saccharomyces* sp, mundialmente utilizada como matriz nutricional, por possuir em sua composição cerca de 30 a 70% de proteínas, ampla gama de vitaminas do complexo B, minerais, macro e micronutrientes (BUENO, 2016). O que não é de possível aplicação neste experimento, visto que a biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 apresenta apenas 4,5% de nitrogênio, sugerindo adição de nitrogênio inorgânico ao meio de cultivo.

No que diz respeito à composição do meio de Vogel tem-se, em sua maioria, C e N, P e K, presentes na forma de KH_2PO_4 (fosfato monopotássio), e Mg e S, presentes na forma de MgSO_4 (sulfato de magnésio), considerados macroelementos, além de microelementos Ca, Zn, Mn, Cu e Fe (Bueno, 2016). A adição desse meio em cultivos voltados a produção de

exopolissacarídeos apresentou melhores resultados com 3,99 g/L, indicando a relevância dos elementos presentes nos sais de Vogel para produção de biocompostos (Bueno, 2016).

Para além, tornam-se uma via de interesse a presença dos bioelementos Ca e Mg que beneficiam o crescimento micelial. O íon Ca^{2+} por ser capaz de modificar a permeabilidade da membrana celular, de maneira a regular o gradiente interno de Ca^{2+} e a atividade de enzimas envolvidas na expansão da parede celular e o íon Mg^{2+} por atuar como cofator em reações enzimáticas e ajudando a estabilizar a membrana plasmática (Bueno, 2016)

7.3 OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Rhizopus* sp LBBIO-01 EM ESCALA AUMENTADA

Nos cultivos realizados em maior escala (frascos de 2000 mL), não foi observada mudança no aspecto macroscópico ou microscópico do micélio, em relação aos cultivos em frascos menores (250 mL). O aspecto macroscópico apresentou micélio disperso, sem aglomerados como *pellets*. A morfologia do micélio no caldo de fermentação interfere nas condições operacionais, podendo aumentar a viscosidade do caldo e causar problemas de operação em tanques agitados. *Pellets* são geralmente a morfologia preferida para fermentação fúngica em larga escala. No entanto, o diâmetro do *pellet* (maior que 0,5 mm) pode proporcionar um núcleo anaeróbico, limitando a transferência de massa e oxigênio. Dessa forma, a morfologia do presente trabalho, embora não tenha a formação de *pellets*, ainda tem a vantagem de favorecer a transferência de oxigênio e nutrientes.

7.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MICÉLIO DE *Rhizopus* sp LBBIO-01.

A análise química da biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 revelou a presença de 34% de carbono orgânico. A tabela 7 apresenta o teor de carbono orgânico de diferentes matérias orgânicas para comparação. Pode-se observar que a biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 apresenta teor de C próximo ou superior a materiais utilizados em adubação de solo, por exemplo, ou usados como ração animal, meio de cultura ou como componente em alimentos processados.

A análise química da biomassa de *Rhizopus* sp LBBIO-01 revelou a presença de 4,5% de nitrogênio. Segundo Bueno (2016), a biomassa de *Rhizopus* sp apresenta teor de N semelhante ao fungo basidiomiceto *Lasioidiplodia theobromae* (5%), Extrato de levedura (10%) e biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* (7%).

Tabela 7. Composição em Carbono (%) de diferentes materiais orgânicos relacionados na literatura.

Material orgânico	C orgânico (%)
torta de usina de cana	44
bagaço de cana de açúcar	41,5
palha de café	52
capim jaraguá	50
palha de trigo	51
esterco (bovino)	36
esterco (suíno)	20
esterco (aves)	30
Biomassa de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	37
Extrato de levedura	28
Biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41

Fonte: EMBRAPA *et al.* (2013).

Tabela 8. Composição em Nitrogênio (%) de diferentes materiais orgânicos relacionados à literatura.

Matéria orgânica	N (%)
Biomassa de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	5
Extrato de levedura	10
Biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7

Fonte: EMBRAPA *et al.* (2013).

8. CONCLUSÕES

8.1 EFICIÊNCIA DO MELAÇO COMO FONTE DE CARBONO

Os resultados deste estudo demonstraram claramente a superioridade do melaço de cana de açúcar em comparação com a sacarose como fonte de carbono para o cultivo de *Rhizopus sp* LBBIO-01. O cultivo em diferentes concentrações de melaço revelou, então, melhor desempenho no crescimento celular, atingindo 6,98 g/L em 50 g/L de melaço e sais de Vogel com nitrato de amônio, enquanto o máximo de 2,8 g/L em 50 g/L de sacarose e sais de Vogel com nitrato de amônio. Os resultados de concentrações mais baixas de melaço (10 e 25 g/L) por mais que tenham apresentado bons resultados demonstraram que quanto maior a disponibilidade de açúcar, maior a obtenção de biomassa fúngica.

8.2 EFICIÊNCIA DAS FONTES DE NITROGÊNIO

O fungo filamentosso *Rhizopus sp* LBBIO-01 apresentou presença de apenas 4,5% de nitrogênio em sua biomassa, sugerindo necessidade de adição de fontes de nitrogênio inorgânicas ao meio de cultivo, uma vez que apresentam menor custo e resultados satisfatórios neste experimento. O meio sais de Vogel com formulação original, contendo nitrato de amônio, foi destacado apresentando resultados mais satisfatórios voltados ao objetivo deste experimento.

8.3 DIFERENÇAS NO PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR

A análise do crescimento celular revelou diferenças marcantes no perfil de crescimento entre os cultivos com melaço e sacarose. Enquanto os cultivos com melaço apresentaram uma fase exponencial de crescimento prolongada, observada até 12 horas de cultivo, com uma velocidade específica de crescimento substancialmente maior (0,328 g/Lh-1), os cultivos com sacarose atingiram sua fase exponencial até 36 horas, com uma velocidade específica de crescimento significativamente menor (0,074 g/Lh-1).

8.4 PRODUTIVIDADE E CONSUMO DE CARBONO

Os cultivos com melaço também demonstraram uma produtividade muito maior, especialmente nas primeiras 6 horas de cultivo, onde os valores foram aproximadamente 3 vezes maiores em comparação com os cultivos com sacarose. Além disso, a rápida utilização dos carboidratos disponíveis, conforme evidenciado pela determinação do teor de açúcar

reduzidor, sugere que a falta de fonte de carbono pode ter limitado o crescimento dos microrganismos.

8.5 IMPACTO NO pH DO MEIO DE CULTURA

O uso de melaço também teve um impacto no pH do meio de cultura, mantendo-o mais ácido em comparação com os cultivos utilizando sacarose, o que pode ter implicações importantes na estabilidade do meio ao longo do tempo.

8.6 PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Os resultados obtidos neste estudo fornecem *insights* valiosos para o desenvolvimento de estratégias de cultivo visando a produção eficiente de biomassa fúngica. Dessa forma, esses achados têm potencial aplicação em diversos setores industriais, incluindo a produção de ingredientes alimentícios e biocombustíveis, contribuindo assim para o avanço do conhecimento na área de bioprocessos. Sabendo que as proporções dos componentes do melaço variam conforme o método de produção e a qualidade da matéria-prima, entende-se que a conjugação da sua rica composição química favoreceu a atividade microbiana e pode ser utilizada em experimentos fermentativos a fim de promover a sustentabilidade e novas descobertas na área de crescimento microbiano.

8.7 PESQUISAS FUTURAS

Sabendo que muitas questões ainda precisam ser respondidas, propõe-se como próximos passos: Identificação da espécie; investigação do perfil de açúcares totais; adição e análise de meios tamponados aos experimentos; revisão e análises da produção e das características enzimáticas do microrganismo; análise e caracterização da produção de polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

- BHANJA, S. K., et al. 2012. Isolation and characterization of the immunostimulating β -glucans of an edible mushroom *Termitomyces robustus* var. **Carbohydrate research**, v. 357, p. 83–89, 1ago.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- BRANDI, J. 28 out. 2011. Chemical Modification of *Botryosphaeran*: Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Water-Soluble Sulfonated (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1036–1042.
- BRANETT, L., H. HUNTER, B. B. 1998, Illustrated Genera of Imperfect Fungi **Amer Phytopathological Society**, v.4, [s. l.].
- BUENO, Y. C. Biomassa do fungo *Lasioidiplodia theobromae*: Composição química e utilização como nutriente para bioprocesso. 2016. 58 f. Orientador: Prof^a. Dr^a. Valéria Marta Gomes do Nascimento. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2016.
- CHEN G., et al. 2013. Polysaccharides from *Rhizopus nigricans* mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells **Carbohydrate Polymers** v. 97, p. 800– 808.
- DUBOIS, M., et al. 1956, Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 356.
- EHRENBERG 1821, *Rhizopus* C.G, **Interin Register of Marine and Nonmarine Genera**,. Disponível em: <https://www.irmng.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1307594>. Acesso em: 10 mar 2025
- EMBRAPA et al. MANUAL DE CALAGEM E ADUBAÇÃO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. 1. ed. Brasília, DF: Editora Universidade Rural, 2013.
- FELTRIN, Valdemar P. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 119-124, 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132000000100015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/sw3bhRrf3GMbhNLGPRJvmCs>. Acesso em: 16 jan. 2025.
- FIGURA 1: Casa das Ciências, *Fungos Zygomycota*, Ilustração, 2014. Disponível em: <https://www.casadasciencias.org/imagem/7692>. Acesso em: 05 dez. 2024.
- FURLAN, Orozimbo *et al.* Pilot scale production of high-content mycoprotein using *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* by submerged fermentation and agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 413, p. 131515, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131515>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852424012197?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jan. 2025.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. 1968. Structural chemistry of fungal polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 23, p. 367–417.

HARNACK, U., et al. 2009. Oral administration of a soluble 1-3, 1-6 beta-glucan during prophylactic survivin peptide vaccination diminishes growth of a B cell lymphoma in mice. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 11, p. 1298–303.

JAIMES, B. J. H. Produção de ácido acrílico de fonte renovável a partir do ácido láctico por fermentação do melaço de cana de açúcar. [s.n.]. Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Wolf Maciel. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2013.

LIMA, M. C. et al, 2017. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* (UCP/WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP/WFCC 1299) e *Rhizopus microsporus* (UCP/WFCC 1304) isolados do solo da Caatinga de Pernambuco. **ENGEVISTA**, v. 19, n.5, p. 1417-1430.

LI, YUJIA, et al. 2023. Changhua. Production of Tetramethylpyrazine from Cane Molasses by *Bacillus* sp. TTMP20. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 2640, MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28062640>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/6/2640>. Acesso em: 17 jan. 2025

LI Z. et al. 2022. Separation and Structural Characterization of a Novel Exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans*. **Molecules**, v. 27, p.7756.

LIU, QIANQIAN et al. *Rhizopus stolonifer* and related control strategies in postharvest fruit: a review. **Heliyon**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 29522, abr. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29522>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11031825/>. Acesso em: 4 nov. 2024.

MAJI, P. K. et al. 2012. Structural characterization and study of immunoenhancing properties of a glucan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 358, p. 110–115.

MATEI, G. M. et al. 2017. Invertase Production by Fungi, Characterization of Enzyme Activity and Kinetic Parameters. **Revista de Chimie** v. 68. p. 2205-2208.

MELLAÇO DE CANA, Comercio de Melaço de Cana ECL Eireli, 2025. Disponível em: <https://mellacodecana.com.br/melaco-de-cana-liquido/>. Acesso em: 10 mar. 2025.

MILLER, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428.

MIYAOKA, M. F. 2012. Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus* spp. na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos. Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol. 2012. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MUSZEWSKA, A.; PAWŁOWSKA, J.; KRZYŚCIAK, P.. Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 1273-1287, 11 mar. 2014. Springer Science and

Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2076-0>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4077243/>. Acesso em: 23 jan. 2025.

NAFADY, N. A., et al. 2016. Enrichment of β -carotene production by *Fusarium camptoceras* grown on sugarcane molasse using statistical approach. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)** v.7, n.3, p. 1186-1203

OLIVEIRA, M. R. B. et al. 2019. Produção de etanol a partir do melaço de cana. **Revista de estudos ambientais** doi: 10.7867/1983-1501.2019v21n1p. v.21, n. 1, p.38- 45.

OLIVEIRA, K.S.M. et al. 2015. (1 $\rightarrow$ 6)- and (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v.133 p. 539–546.

PALMONARI, A., et al. 2020. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. **Journal Dairy Science**. v. 103, n. 7, p.6244-6249.

PEREIRA, L. T. C., LEMOS, J. L. S. 2004, Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*, , **Mineralis - Cetem**, Revista online, [s. l.]. Disponível em: <http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/796/1/22Artigo%20JIC%202004%20Lucas%20Tupi%20e%20Judith%20Liliana.pdf>. Acesso em: 15 jan 2025.

PIDOPLICHKO N. M., MIL'KO A. A., 1971. **Atlas of Mucoralean Fungi**, Naukova Dumka, Kyiv.

REGAND, A. et al. 2011. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 297–304.

SANDOVAL, Juan F. *et al.* Improved nutritional value of surplus bread and perennial ryegrass via solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. **Npj Science Of Food**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 95, 16 nov. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41538-024-00338-y>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11569167/#Sec1>. Acesso em: 05 jan. 2025.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, Infraestrutura e Logística, **Portal de Educação Ambiental**, 2025. Disponível em: <https://semil.sp.gov.br/educacaoambiental/2023/09/o-que-sao-os-ods-e-o-que-voce-tem-a-ver-com-isso/> Acesso em 10 mar. 2025

SILVA, C.F.R., NASCIMENTO, I.V., NASCIMENTO, V.M.G.2023. Production of *Rhizopus* sp biomass using whey. **Congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, PR.

SMIDERLE, F. et al. 2013. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 91–99.

SMIDERLE, F. R. et al. 2011. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.1.

- SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. 2013 Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 12^a Ed. Artmed, 2017
- UIJANIA, V.K.; QURESHI, K.; SEVAK, C. 2022. **Single Cell Protein**. Just Agriculture: multidisciplinary e-Newsletter, [s. l.], v. 2, ed. 10, p. 1-11
- VOGEL, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbial Genetic Bulletin**, v.13, p.42-43,
- YAN H. et al. 2022. Extracellular polysaccharide from *Rhizopus nigricans* Inhibits Hepatocellular Carcinoma via miR-494-3p/TRIM36 Axis and Cyclin E Ubiquitination **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v.10, p.608–619.
- YANG Y. et al. 2021. Value added immunoregulatory polysaccharides of *Hericium erinaceus* and their effect on the gut microbiota. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p.117668.
- YU, C. et al. 2024 Efficient conversion of cane molasses into *Tremella fuciformis* polysaccharides with enhanced bioactivity through repeat batch culture. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 264, n.130536.
- YU W. et al. 2016. Purification, partial characterization and antitumor effect of an exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans* **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82 p.299–307.
- YU Z. et al. 2018. Beneficial effects of extracellular polysaccharide from *Rhizopus nigricans* on the intestinal immunity of colorectal cancer mice **International Journal of Biological Macromolecules**, v.115, p.718–726.
- YU Z. et al. 2018. Polysaccharide from *Rhizopus nigricans* inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p.738–745.