

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO FERREIRA BARRETO

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DA PULULANA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2021

MARCELO FERREIRA BARRETO

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE
PULULANA**

Optimization of fermentative parameters to obtain pullulan

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito à obtenção do título de bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Departamento Acadêmico de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dr. Sabrina Ávila Rodrigues.

PONTA GROSSA

2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MARCELO FERREIRA BARRETO

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE
PULULANA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 10/dezembro/2021

Sabrina Ávila Rodrigues
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Juliana Vitoria Messias Bittencourt
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Luis Alberto Chavez Ayala
Mestre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2021

RESUMO

A Pululana é um exopolissacarídeo de interesse comercial por ser hidrossolúvel e biodegradável, que pode ser utilizado na formulação de produtos cosméticos, alimentícios, de embalagens, entre outros, para um maior valor ambiental. Esse exopolissacarídeo é produzido principalmente pelo fungo *Aureobasidium pullulans*. O estudo apresenta uma otimização dos parâmetros fermentativos, para produção de pululana e de biomassa, analisados separadamente, de duas cepas distintas de *Aureobasidium pullulans* avaliando o pH e a concentração de sacarose e de sulfato de amônio em um meio de cultivo líquido. Com o resultado da otimização realizada, escolheu-se os parâmetros fermentativos de uma das cepas por apresentar melhor confiabilidade, e realizou-se novos experimentos em um meio de cultivo igual ao da fase de otimização, porém agora com pH inicial de 4,32, sacarose 117 g/L e de sulfato de amônio 0,62 g/L, sendo monitoradas as respostas de grau Brix, pH, viscosidade do caldo fermentado e concentração de pululana e de biomassa, o que resultou na definição de um tempo de fermentação ideal de 96h, equações preditivas para cada resposta, além de uma curva que correlaciona a concentração de pululana no caldo fermentativo com a viscosidade, que pode ser utilizada para analisar a concentração de pululana no caldo fermentativo rapidamente e sem custos de extração e de secagem.

Palavras-chave: *Aureobasidium pullulans*; pululana; otimização; viscosidade.

ABSTRACT

Pullulan is an exopolysaccharide that has a commercial interest for being water soluble and biodegradable, and for being utilized in cosmetical industry, food industry, packaging industry and others because of its environmental value. The fungus *Aureobasidium pullulans*, utilized in this study, is the most utilized microorganism for producing pullulans. This study shows the optimized values of the fermentative parameters of two strains of this fungus and utilizes it to make another experiment using the optimized parameters with initial pH 4,32 , sucrose 117 g/L and ammonium sulfate 0,62 g/L, with daily monitoring of the responses of Brix degree, pH, biomass, pullulan concentration and viscosity. It may help in future studies predicting the time necessary for a desirable value and It can be used to determine the pullulan concentration in the medium without using reagents to extract pullulan and after that expending energy drying.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*; pullulan; optimization; viscosity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química da Pululana	15
Figura 2 - Fluxograma das etapas do estudo	19
Figura 3 - Otimização pululana máxima da cepa CCT 4154.....	28
Figura 4 - Modelo do delineamento de pululana com a cepa CCT 4154.....	29
Figura 5 - Otimização biomassa máxima da cepa CCT 4154.....	34
Figura 6 - Modelo do delineamento de biomassa com a cepa CCT 4154	35
Figura 7 - Otimização pululana máxima da cepa B	41
Figura 8 - Modelo do delineamento de pululana com a cepa B	42
Figura 9 - Otimização biomassa máxima da cepa B	44
Figura 10 - Modelo do delineamento de biomassa com a cepa B.....	45

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Shaker com os experimentos	21
Fotografia 2 - Pululana após a adição de etanol	23
Fotografia 3 - Pululana extraída após processo de secagem	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de pululana da cepa CCT 4154.....	28
Gráfico 2 - Pareto de Pululana com a cepa CCT 4154.....	30
Gráfico 3 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando o sulfato de amônio.....	31
Gráfico 4 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando a sacarose.....	32
Gráfico 5 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando o pH..	33
Gráfico 6 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de biomassa da cepa CCT 4154.....	34
Gráfico 7 - Pareto de biomassa com a cepa CCT 4154.....	36
Gráfico 8 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando o sulfato de amônio.....	37
Gráfico 9 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando a sacarose.....	38
Gráfico 10 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando o pH.....	39
Gráfico 11 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de pululana da cepa B.....	42
Gráfico 12 - Gráfico de Pareto de Pululana com a cepa B.....	43
Gráfico 13 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de biomassa da cepa B.....	44
Gráfico 14 - Pareto de biomassa com a cepa B.....	45
Gráfico 15 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando o sulfato de amônio.....	46
Gráfico 16 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando a sacarose.....	47
Gráfico 17 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando o pH.....	48
Gráfico 18 - Evolução diária da biomassa utilizando a cepa CCT 4154.....	50
Gráfico 19 - Evolução diária do pH utilizando a cepa CCT 4154.....	51
Gráfico 20 - Evolução diária da pululana utilizando a cepa CCT 4154.....	52
Gráfico 21 - Evolução diária do grau Brix utilizando a cepa CCT 4154.....	53
Gráfico 22 - Evolução diária da viscosidade utilizando a cepa CCT 4154.....	54
Gráfico 23 - Viscosidade do caldo fermentado em relação a pululana extraída da cepa CCT 4154.....	54
Gráfico 24 - Curva avaliando a viscosidade do caldo fermentado de 96h da cepa CCT 4154 variando a velocidade de rotação.....	55
Gráfico 25 - Evolução diária da biomassa utilizando a cepa B.....	56
Gráfico 26 - Evolução pH diário da biomassa utilizando a cepa B.....	57
Gráfico 27 - Evolução diária do grau Brix utilizando a cepa B.....	58
Gráfico 28 - Evolução diária da viscosidade a 30 rpm utilizando a cepa B.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento DCCR	24
Tabela 2 - Delineamento DCCR Cepa CCT 4154 com as respostas experimentais	26
Tabela 3 - Delineamento DCCR da cepa B com as respostas experimentais	40
Tabela 4 - Respostas perfil diário da cepa CCT 4154	49
Tabela 5 - Respostas perfil diário da cepa B.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

h	Horas
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
g/L	Gramas por Litro
mL	Microlitros
mPa.s	Milipascal vezes segundo
K ₂ HPO ₄	Fosfato de dipotássico
G	Força Centrífuga Relativa
NaCl	Cloreto de sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
NaOH	Hidróxido de Sódio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
DCCR	Delineamento composto central rotacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS DO ESTUDO	14
2.1 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Pululana	15
3.2 <i>Aureobasidium pullulans</i>	16
3.3 Parâmetros Fermentativos	17
3.3.1 Temperatura	17
3.3.2 pH.....	17
3.3.3 Fonte de Nitrogênio	18
3.3.4 Fonte de Carbono	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Microrganismo	20
4.2 Fermentação para produção de pululana	20
4.3 Métodos analíticos e de extração	22
4.3.2 Viscosidade e Outras Respostas	24
4.4 Planejamento Experimental	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1 Otimização Cepa CCT 4154	26
5.1.1 Produção de Pululana pela cepa CCT 4154	27
5.1.1.1 <u>Solução para concentração máxima de Pululana</u>	27
5.1.1.2 <u>Análise do Modelo e Gráficos de Pareto</u>	29
5.1.1.3 <u>Gráficos de Contorno</u>	30
5.1.2 Produção de Biomassa pela cepa CCT 4154.....	33
5.1.2.1 <u>Solução para produção máxima de biomassa</u>	34
5.1.2.2 <u>Análise do modelo e Gráfico de Pareto</u>	35
5.1.2.3 <u>Gráficos de Contorno</u>	36
5.2 Cepa B	39
5.2.1 Produção de Pululana pela cepa B	40
5.2.1.1 <u>Solução para concentração máxima de Pululana</u>	41
5.2.1.2 <u>Análise do Modelo e Gráficos de Pareto</u>	42
5.2.2 Produção de Biomassa pela cepa B	43
5.2.2.1 <u>Solução para produção máxima de biomassa celular</u>	43
5.2.2.2 <u>Análise do Modelo e Gráficos de Pareto</u>	45
5.1.1.3 <u>Gráficos de Contorno</u>	46

5.3 Experimento Otimizado	48
5.3.1 Análise diária cepa CCT 4154	49
5.3.2 Análise diária cepa B	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma demanda mundial por materiais que possam substituir o plástico em diversos tipos de embalagens, pois devido ao seu descarte inadequado e a falta de consciência da população, acabam poluindo cidades, causando enchentes e alagamentos, chegando aos rios seja na forma de plástico normal ou de microplásticos que acabam sendo ingeridos pela população, poluem oceanos, matando animais que acabam ingerindo os materiais plásticos procurando alimento, entre outros problemas. Ainda assim os materiais plásticos são muito utilizados por apresentarem baixo custo além de terem ótimas características físicas para embalar produtos, como resistência a choques mecânicos, impermeabilidade à diversos gases, de fácil moldagem no formato desejado, além de ser inerte a maioria dos produtos (FILHO; SOUSA; CASTRO, 2020).

Os biopolímeros, polímeros naturais, derivados sobretudo de plantas, algas marinhas e microrganismos, são visados para substituir os materiais plásticos derivados do petróleo, pois apresentam vida útil bem menor, evitando problemas como acúmulos decorrentes da poluição, além de utilizarem fontes renováveis. Dentre os biopolímeros, existem os biopolímeros de origem fermentativa, que são muito utilizados devido às suas características reológicas por formar soluções viscosas, o que é um fator de interesse em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos entre outras áreas, além de poderem ser facilmente modificados e apresentarem bons níveis de biocompatibilidade (OLIVEIRA, 2014).

Porém a produção e uso de biopolímeros enfrenta várias barreiras, pois apresentam custos de produção mais elevados, técnicas produtivas bastante complexas (sobretudo os biopolímeros de fontes fermentativas) e ainda não tão bem estabelecidas, além de em muitos casos apresentarem propriedades físicas inferiores para uso em embalagens. Por isso, são estudadas maneiras de baratear a produção e contornar as deficiências das características dos materiais, como utilizar biopolímeros diferentes em combinação, elaborar novos métodos produtivos, descobrir novos biopolímeros e ainda, no caso de biopolímeros fermentativos, otimizar os parâmetros dessas fermentações, de modo a produzir mais biopolímeros utilizando menos tempo, energia e matérias primas, que é o caso deste estudo (SUEIRO *et al.*, 2016).

A pululana, que é alvo de otimização produtiva neste estudo, é um biopolímeros fermentativo, que pode ser utilizada em diversos produtos como emulsificante, filme inodoro atóxico e comestível, como veículo de fármacos, como um produto prebiótico, entre outras aplicações (OLIVEIRA, 2014; SUEIRO *et al.*, 2016). Porém é considerado um biopolímeros caro em comparação com outros biopolímeros, sendo necessários mais estudos de forma a baratear a produção deste biopolímero (SUEIRO *et al.*, 2016).

O estudo busca o barateamento deste produto através da otimização dos parâmetros fermentativos para produção de pululana, identificando os melhores parâmetros e assim tornando o processo fermentativo mais rentável e produtivo.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Este projeto de estudo tem como objetivo a otimização da produção do exopolissacarídeo pululana, por meio da fermentação do microrganismo *Aureobasidium pullulans* CCT 4154, avaliando diferentes composições do meio de cultivo. Deste modo almejando um processo mais rentável e produtivo para esse exopolissacarídeo, além de entender melhor o comportamento deste microrganismo nas condições do estudo.

2.1 Objetivos Específicos

1. Analisar o melhor pH para produção de pululana, no intervalo de estudo entre 4,32 – 7.68, utilizando ferramentas estatísticas;
2. Avaliar a melhor concentração de sacarose para produção de pululana no intervalo de 33 g/L – 117 g/L com o meio de cultivo do estudo utilizando ferramentas estatísticas;
3. Investigar a melhor concentração de sulfato de amônio para produção de pululana, no intervalo de 0,26 g/L - 0,94 g/L com o meio de cultivo do estudo, utilizando ferramentas estatísticas;
4. Predizer a maior produção de pululana possível no meio de cultivo de estudo, alternando os parâmetros de pH, concentração de sacarose e concentração de sulfato de amônio;
5. Identificar a produção de biomassa e comparar com a produção de pululana;
6. Apresentar o perfil diário de evolução da produção de pululana, biomassa, grau Brix e viscosidade;

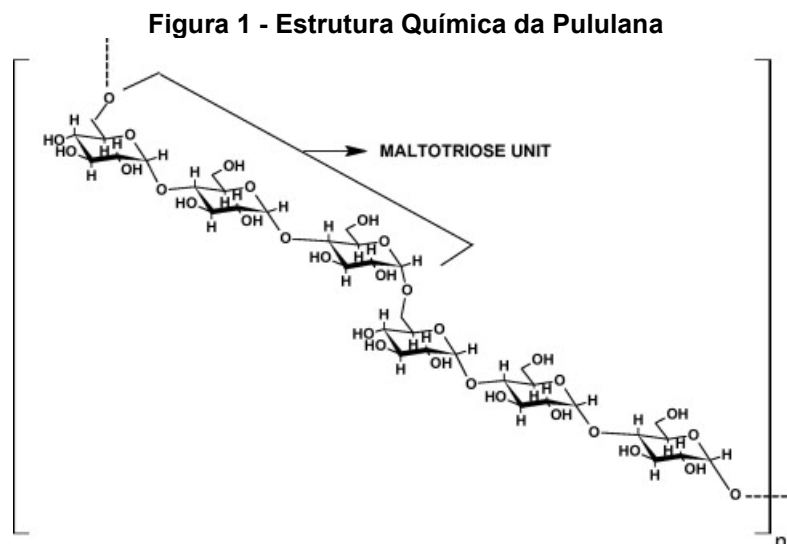
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pululana

A Pululana é um exopolissacarídeo hidrossolúvel e insolúvel na maioria dos solventes inorgânicos (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017). Esse exopolissacarídeo é formado por unidades de maltotriose em ligações glicosídicas α -(1,6), apresentando uma estrutura que lhe confere propriedades biodegradáveis além de ser hidrossolúvel, apresentando um forte potencial para produtos sustentáveis (YANG *et al.*, 2018). A Pululana pode ser utilizada na produção de embalagens e de revestimentos na forma de filme, na formulação de cosméticos devido às suas propriedades adesivas, na composição de alimentos de baixa caloria, entre outras aplicações industriais associadas às suas propriedades (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017; XIA; WU; PAN, 2011).

O estudo de Oliveira *et al.* (2012), demonstra um perfil de viscosidade de um meio fermentado contendo a pululana, demonstrando sua viscosidade e sugerindo um comportamento de fluido pseudoplástico.

A figura 1 mostra a estrutura química da pululana indicando a unidade repetidora de maltotriose do polímero:



Fonte: SINGH; SAINI; KENNEDY (2008)

3.2 *Aureobasidium pullulans*

O fungo *Aureobasidium pullulans* é conhecido por apresentar um excelente nível de produção do exopolissacarídeo pululana (YANG *et al.*, 2018). Esse fungo é ubíquo, vive em solos, na água salgada e doce, em rochas, em tecidos animais e vegetais, além de poder sobreviver em condições extremas como em ambientes desertos e solos glaciais (LIU; ZHANG; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017; ZHANG *et al.*, 2021).

Essa espécie é classificada no filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, subclasse Dothideomycetidae, ordem Dothideales, família Dothioraceae e gênero *Aureobasidium* (SUZUKI *et al.*, 2021).

Aureobasidium pullulans é uma levedura do filo conhecido como “levedura negra”, por ser um produtor de melanina, o que lhe confere características de resistência ambiental e de situações de estresse. Porém é um fator que dificulta e encarece o processo de produção, por ser necessário o emprego de técnicas de purificação do produto (LIU *et al.*, 2021).

Esse fungo apresenta um ciclo de vida polimórfico bastante complexo, que consiste de um sistema de diferentes formas unicelulares e de micélios filamentosos onde as hifas podem produzir novas células por brotamento. Essas células podem ser de dois tipos, blastosporos de brotamento e células grandes que formam uma estrutura multicelular que podem ser convertidas em melanina, os chamados clamidósporos presentes em situações de estresse celular (CAMPBELL *et al.*, 2004).

Alguns estudos buscam avaliar qual a melhor morfologia do fungo para a produção de pululana mas ainda não foi definido plenamente a melhor morfologia devido à complexidade do estudo além de diferentes estudos apresentarem dados contrários entre si, onde alguns estudos sugerem que a melhor forma morfológica para a produção da pululana seria na forma de blastosporos, enquanto outros estudos apresentam melhor produção de pululana no crescimento micelial (CAMPBELL *et al.*, 2004; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017).

3.3 Parâmetros Fermentativos

Vários fatores influenciam na capacidade de produção de pululana pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, destacando-se a temperatura, pH, a fonte de nitrogênio e a fonte de carbono (SHENG; ZHU; TONG, 2014; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017).

3.3.1 Temperatura

A temperatura ótima para produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans*, é diferente da temperatura ótima de crescimento do fungo e pode apresentar variações dependendo da cepa utilizada, sendo relatadas temperaturas ótimas entre 24 °C e 30°C (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017).

De acordo com o estudo de Wu, *et al.* (2009), uma alternativa para melhorar o rendimento seria uma fermentação de duas fases, onde na inicial a temperatura ótima de crescimento é utilizada para acúmulo de biomassa, para na segunda fase alternar para a temperatura ótima de produção de pululana, autor apresenta a temperatura ideal de 32 °C para produção de biomassa, e 26 °C na produção de pululana, onde a troca foi efetuada após 48 h de fermentação e a produção estagnou após 96 h de fermentação.

Porém no caso de temperatura fixa durante a fermentação, os autores Wang, Yu e Gongyuan (2013) utilizaram uma temperatura de 30 °C, enquanto os autores Sheng, Zhu e Tong (2014) utilizaram uma temperatura de 28 °C para a produção de pululana.

3.3.2 pH

O pH ideal apresenta lógica similar à da temperatura, onde é dependente da cepa de *Aureobasidium pullulans* utilizada e ainda apresenta níveis diferentes entre a produção de biomassa e da produção de pululana (XIA; WU; PAN, 2011).

Como a fermentação desse fungo libera ácidos orgânicos com o tempo, o pH do meio se altera, sendo necessário seu controle para melhor rendimento na produção de pululana. Wang, *et al.* (2015) realizou um estudo para avaliar o melhor pH controlado e correlacionou com uma fermentação realizada em pH inicial de 6,5 sem controle, onde apresentou uma produção de 26,8 g/L em pH de 3,8 enquanto o pH de 6,5 apresentou uma produção de 22,8 g/L, evidenciando que o controle de pH resulta em melhor rendimento produtivo.

3.3.3 Fonte de Nitrogênio

A fonte de nitrogênio no meio de cultivo é usada pelo fungo para crescimento e formação de biomassa, sendo necessária uma limitação para produção adequada de pululana. As fontes que se mostram superiores para a produção de pululanas são os extratos de levedura além do sulfato de amônio (WANG *et al.*, 2015).

O estudo de Sheng, Zhu e Tong (2014) comparou a produção de pululana num meio com 1,2 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) com outro meio com concentração de 0,6 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), ambos contendo ainda 0,9 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, onde o ensaio com 0,6 g/L de sulfato de amônio apresentou uma maior produção de pululanas.

3.3.4 Fonte de Carbono

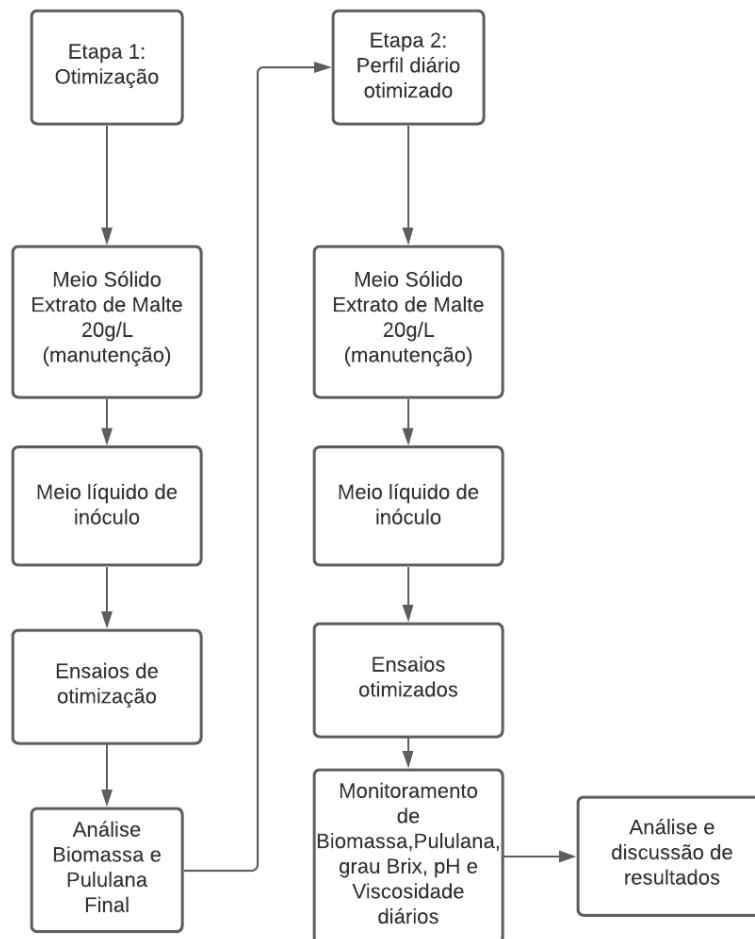
A fonte de carbono, pode afetar a produção de pululanas dependendo da complexidade necessária para metabolizar essa fonte. O uso de resíduos agroindustriais nesse cultivo é muito estudado, visando diminuir os custos da fermentação, porém na questão de maior produtividade a fonte de carbono com maior rendimento é a sacarose na maioria dos estudos, porém algumas cepas podem apresentar outras fontes ótimas, como a frutose. No caso da sacarose, muitos estudos utilizam concentrações entre 20 g/L e 100 g/L (SHENG; TONG; MA, 2016; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017; YANG *et al.*, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa a otimização do experimento através de um delineamento central rotacional (DCCR), que gerou 17 ensaios experimentais realizados para cada cepa, onde variou-se o pH inicial e a concentração de sacarose e de sulfato de amônio do meio de cultivo analisado, então com os resultados obtidos experimentalmente dos 17 ensaios realizados, obteve-se os valores otimizados para cada um desses parâmetros. Com os valores otimizados iniciou-se a segunda etapa do estudo que seria o monitoramento diário das respostas de grau Brix, pH, viscosidade e concentração de pululana e de biomassa.

A metodologia descrita no parágrafo anterior é apresentada de forma resumida no fluxograma da figura 2:

Figura 2 - Fluxograma das etapas do estudo



Fonte: Autoria Própria (2021)

4.1 Microrganismo

Para essa pesquisa foram utilizadas duas cepas do fungo *Aureobasidium pullulans*, a cepa CCT 4154, obtida da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, e a cepa B, de código desconhecido, obtido da Universidade Federal do Ceará.

O microrganismo foi mantido em um meio sólido de manutenção, renovado semanalmente durante o período de estudo, em um meio com a seguinte composição: extrato de malte 20 g/L e ágar bacteriológico 20g/L (SANTOS, 2020).

As cepas deste microrganismo foram inoculadas à partir do meio sólido de manutenção, em um meio de inóculo líquido com a seguinte composição: sacarose 50 g/L, fosfato dipotássico (K₂HPO₄) 4 g/L, cloreto de sódio (NaCl) 2 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 0,8 g/L, e sulfato de magnésio(MgSO₄) 0,2 g/L. Esse meio foi corrigido com uso de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), para apresentar um pH de 6,5 e após isso esterilizado em 121 °C por 15 minutos antes de se realizar a inoculação. Esse meio líquido de inóculo foi fermentado por 48h e inoculado 5mL do caldo fermentado em cada ensaio do estudo (SHENG; ZHU; TONG, 2014).

4.2 Fermentação para produção de pululana

Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 150 mL de meio de cultivo de composição similar ao meio de inóculo: fosfato dipotássico (K₂HPO₄) 4 g/L, cloreto de sódio (NaCl) 2 g/L, extrato de levedura 0,9 g/L, sulfato de magnésio(MgSO₄) 0,2g/L e diferentes concentrações de sacarose e sulfato de amônio. Cada ensaio fermentativo foi realizado em um shaker em temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm por um período de 72 h. A fotografia 1 apresenta o shaker utilizado no estudo:

Fotografia 1 - Shaker com os experimentos



Fonte: Aatoria Própria (2021)

Na primeira etapa do estudo foram avaliados os melhores parâmetros de pH inicial, concentração de sacarose e concentração de sulfato de amônio para otimização da produção do exopolissacarídeo pululana em uma fermentação de 3 dias. O pH inicial do meio apresentou valores de 4,32; 5,0; 6,0; 7,0 ou 7,68 dependendo do ensaio realizado. A sacarose variou nos valores de 33 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L e 117 g/L. Já o sulfato de amônio variou entre os valores de 0,264 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L, 0,8 g/L e 0,936 g/L.

Na segunda etapa de estudo, foram utilizados os dados obtidos da primeira etapa para prever a melhor produção de pululana e quais os melhores valores dos parâmetros avaliados no estudo. Assim, com esses valores, foi realizado um novo experimento, com 5 frascos de cada cepa, onde diariamente foi retirado um frasco de

capa cepa para análise do grau Brix, pH, concentração de biomassa e extração de pululana.

4.3 Métodos analíticos e de extração

4.3.1 Biomassa celular e Pululana

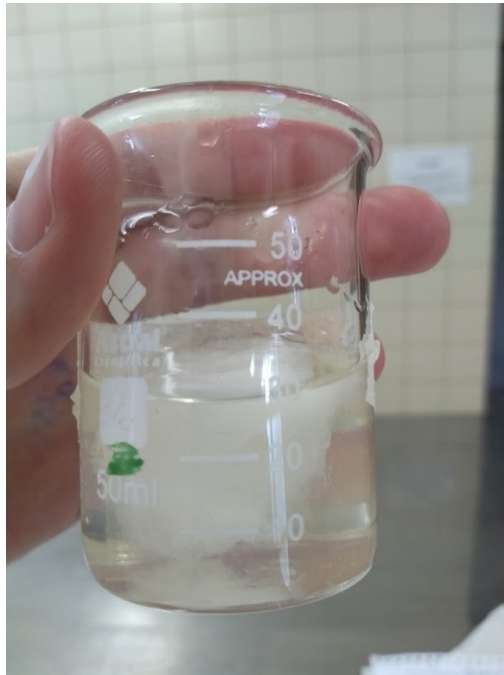
Após o tempo desejado de fermentação, o frasco é retirado para as análises das respostas desejadas.

Para a avaliação da biomassa e da extração da pululana, foram adicionados 30mL do meio fermentado em um tubo falcon de 50mL, pesado previamente, e centrifugado a 15000xG e 4°C por um período de 15 minutos em uma centrífuga.

Após a centrifugação, o sobrenadante do tubo falcon foi colocado em um béquer, previamente pesado, e adicionado 60mL de álcool resfriado em geladeira comum, após isso o volume foi agitado e foi separada a massa sólida de pululana por meio do descarte do material líquido com o auxílio de uma espátula para evitar que a massa de pululana seja descartada junta. Após isso, o béquer com a pululana úmida além do falcon com biomassa no fundo, são secados em uma estufa de secagem a 60°C por 24h e posteriormente pesados para ser calculado a concentração dos dois produtos fermentativos no caldo. (XIA; WU; PAN, 2011).

A fotografia 2 mostra a aparência da pululana no béquer antes de ter o solvente esgotado e secado:

Fotografia 2 - Pululana após a adição de etanol



Fonte: Aatoria Própria (2021)

E a fotografia 3 apresenta a pululana após o processo de secagem, apresentando uma grande diminuição de volume:

Fotografia 3 - Pululana extraída após processo de secagem



Fonte: Aatoria Própria (2021)

O mesmo procedimento foi realizado com uma amostra inicial do meio de cultivo não inoculado e também nos frascos com inóculo líquido pronto para ser

utilizado, para considerar as influências do meio de cultivo e do inóculo nas massas de biomassa e de pululana nas amostras.

4.3.2 Viscosidade e Outras Respostas

A Viscosidade foi analisada através de um viscosímetro da marca Brookfield, e utilizando o spindle SC4-18.

Para a análise da viscosidade no equipamento, foi utilizado o modo rampa de velocidade, começando em 0 rpm e subindo para 30,60,90,120,150 rpm, com permanência de 60s em cada velocidade e análises da viscosidade em mPa.s a cada 10 segundos. Este modo de análise permite avaliar o comportamento do fluido, se altera ou não a viscosidade com o aumento da rotação.

A partir dos resultados obtidos de viscosidade, foi calculada a média simples dos valores obtidos de cada velocidade, para elaboração do gráfico de viscosidade do último ensaio da segunda parte do estudo que utilizou as variáveis já otimizadas para avaliação do perfil diário das amostras. Para as amostras iniciais e intermediárias apenas foi utilizado a viscosidade em 30 rpm para evitar o comportamento pseudoplástico em rotações maiores, e colocados em um gráfico conjunto com as viscosidades dos frascos de outros dias para avaliar a evolução na viscosidade.

Na análise do grau Brix, foi utilizado um refratômetro manual, adicionando-se uma gota do caldo fermentado e realizando a leitura no instrumento. Já para o pH, foi utilizado um peagâmetro de bancada, utilizando um pequeno volume do caldo fermentado.

4.4 Planejamento Experimental

O experimento deste estudo foi realizado em um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 3 fatores contínuos utilizando o software Minitab, para apresentar os ensaios e a otimização dos melhores parâmetros.

A tabela 1 mostra o delineamento DCCR realizado, apresentando 17 ensaios:

Tabela 1 - Delineamento DCCR

Ensaio	pH Inicial	Sacarose(g/L)	Sulfato de Amônio(g/L)
1	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)

(continua)

Tabela 1 - Delineamento DCCR

Ensaio	pH Inicial	Sacarose(g/L)	Sulfato de Amônio(g/L)
2	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)
3	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)
4	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)
5	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)
6	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)
7	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)
8	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)
9	4,32 (-1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)
10	7,68 (+1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)
11	6,00 (0)	33,00 (-1,68)	0,60 (0)
12	6,00 (0)	117,00 (+1,68)	0,60 (0)
13	6,00 (0)	75,00 (0)	0,264 (-1,68)
14	6,00 (0)	75,00 (0)	0,936 (+1,68)
15	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)
16	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)
17	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)

(conclusão)**Fonte: Autoria Própria (2021)**

Essa tabela apresenta os 17 ensaios realizados experimentalmente para obtenção das respostas de concentração de biomassa e de concentração de pululana para avaliar qual a melhor combinação de parâmetros dentro do intervalo de estudo de cada variável.

Cada resposta do delineamento estatístico foi analisada de forma independente da outra, não havendo relação entre as duas respostas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A otimização de delineamento composto central rotacional foi realizada para cada cepa e com resultados separados para a resposta de biomassa produzida e de pululana produzida. Os resultados experimentais de cada cepa nas 17 amostras e os resultados estatísticos extraídos do software Minitab, como gráficos de Pareto, R^2 do modelo, otimização dos melhores parâmetros, gráficos de contorno, além da discussão de cada resultado, estão dispostos a seguir.

5.1 Otimização Cepa CCT 4154

O experimento utilizando a cepa CCT 4154 apresentou bons resultados estatísticos na otimização da produção de pululana, pois apresentou um R^2 próximo de 0,9 o que é algo considerado bom se tratando de experimentos microbiológicos, que podem apresentar variações imprevisíveis. e mostra que as amostras apresentam dados mais ajustados e próximos ao modelo produzido, sendo considerado um modelo preditivo.

Os resultados da otimização de produção de biomassa apresentaram R^2 inferior ao da produção de pululana mas que pode ser considerado de um modelo preditivo. Essa diferença de predição entre os dois modelos, pode ser explicada pela diferente capacidade metabólica de cada célula em diferentes condições de cultivo que podem levar a uma maior produção de pululana com pouca biomassa, e em outras condições que podem levar a um maior crescimento celular ao invés da produção do polímero.

A tabela 2 mostra os 17 ensaios do experimento com essa cepa, apresentando também a pululana e a biomassa produzida em cada amostra:

Tabela 2 - Delineamento DCCR Cepa CCT 4154 com as respostas experimentais
(continua)

Ensaio	pH Inicial	Sacarose(g/L)	Sulfato de Amônio(g/L)	Biomassa(g/L)	Pululana(g/L)
1	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)	4,67	12,20
2	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)	3,87	15,23
3	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)	4,87	22,23
4	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)	4,73	25,10

**Tabela 2 - Delineamento DCCR Cepa CCT 4154 com as respostas experimentais
(conclusão)**

Ensaio	pH Inicial	Sacarose(g/L)	Sulfato de Amônio(g/L)	Biomassa(g/L)	Pululana(g/L)
5	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)	5,53	17,90
6	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)	5,70	17,77
7	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)	5,47	16,90
8	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)	4,97	9,63
9	4,32 (-1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)	5,40	22,50
10	7,68 (+1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)	5,77	14,23
11	6,00 (0)	33,00 (-1,68)	0,60 (0)	3,83	12,27
12	6,00 (0)	117,00 (+1,68)	0,60 (0)	3,80	18,23
13	6,00 (0)	75,00 (0)	0,264 (-1,68)	4,37	14,07
14	6,00 (0)	75,00 (0)	0,936 (+1,68)	4,37	9,70
15	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	4,33	17,73
16	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	5,60	21,93
17	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	4,77	21,50

Fonte: Autorial Própria (2021)

Assim, utilizando as respostas obtidas experimentalmente, foram realizadas as análises estatísticas pelo software Minitab, para obtenção da otimização de cada uma das duas respostas.

5.1.1 Produção de Pululana pela cepa CCT 4154

5.1.1.1 Solução para concentração máxima de Pululana

A solução de parâmetros para maximizar a produção de pululana, dentro da faixa de estudo, é mostrada a seguir, na figura 3:

Figura 3 - Otimização pululana máxima da cepa CCT 4154

Solução

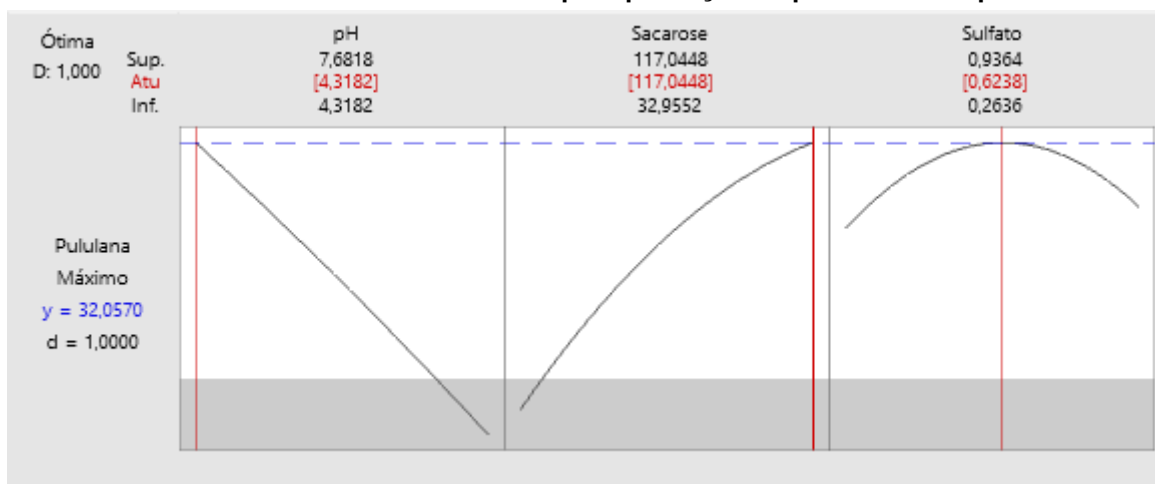
Solução	pH	Sacarose(g/L)	Sulfato de Pululana(g/L)		Desirability
			Amônio(g/L)	Ajuste Composta	
1	4,31821	117,045	0,623783	32,0570	1

Fonte: Aatoria Própria (2021)

Essa solução indica uma previsão de que se fosse realizado uma fermentação nas condições de cultivo com pH 4,318, sacarose 117,045g/L e sulfato de amônio 0,624g/L, poderia produzir 32,057g/L de pululana caso experimento fosse realizado novamente nas mesmas condições do delineamento experimental anterior.

O resultado de sulfato de amônio é próximo ao de 0,60 g/L indicado como melhor valor pelo estudo de Sheng, Zhu e Tong (2014), que analisava diferentes concentrações de sulfato de amônio utilizando o mesmo meio de cultivo deste estudo. O pH inicial ótimo é inferior ao estudo de Wang, Yu e Gongyuan (2013) que apresentou uma produção de 22,8 g/L em pH inicial de 6,5 que foi próxima ao valor do experimento de pH controlado ideal. Já em relação a sacarose, apresentou valores similares a de alguns estudos utilizados na literatura.

Gráfico 1 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de pululana da cepa CCT 4154



Fonte: Aatoria Própria (2021)

O modelo preditivo, apresentado no gráfico 1, mostra que dentro desta faixa de estudo, para produzir maior concentração de pululana, deve-se diminuir o pH ao ponto mínimo de estudo, pH de 4,3182, aumentar a concentração de sacarose para o nível máximo de estudo de 117,045g/L além de colocar o sulfato na concentração de

0,624g/L. Nesta faixa de estudo o pH apresentou comportamento de uma reta que aumenta a concentração de pululana quando o pH abaixa, a sacarose aparenta apresentar um comportamento de parábola com concavidade para baixo (mas é necessário aumentar a faixa de concentração de sacarose para confirmar esse comportamento), e o sulfato de amônio apresentou uma parábola com concavidade para baixo bem definida, apresentando que caso o comportamento da curva permaneça igual em outros intervalos, é o melhor ponto para produção de pululana.

5.1.1.2 Análise do Modelo e Gráficos de Pareto

O modelo da cepa CCT 4154 para produção de pululana, apresentou R^2 de 88,22%, como mostrado no sumário a seguir, na figura 4, retirado do software estatístico:

Figura 4 - Modelo do delineamento de pululana com a cepa CCT 4154

Sumário do Modelo

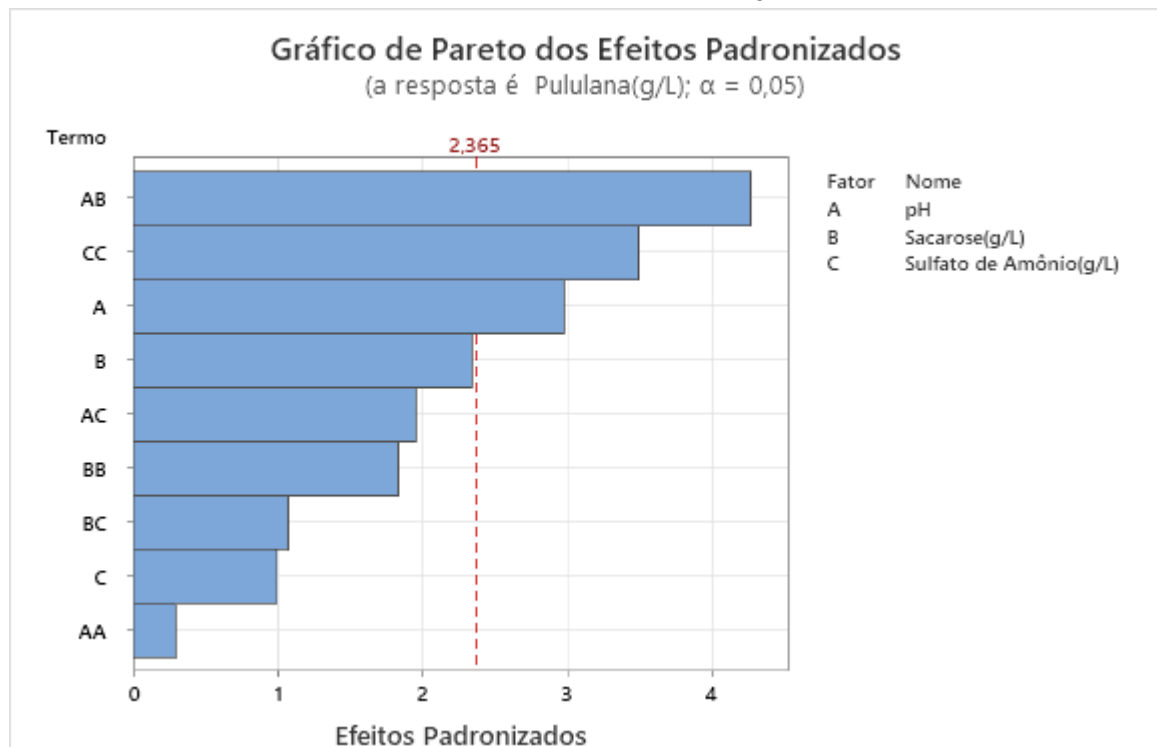
S	R2	R2(aj)	R2(pred)
2,40472	88,22%	73,08%	24,61%

Fonte: Autoria Própria (2021)

Assim como discutido anteriormente, é um modelo preditivo para um experimento biológico.

O gráfico 2 apresenta o gráfico de pareto do modelo estatístico para produção de pululana:

Gráfico 2 - Pareto de Pululana com a cepa CCT 4154



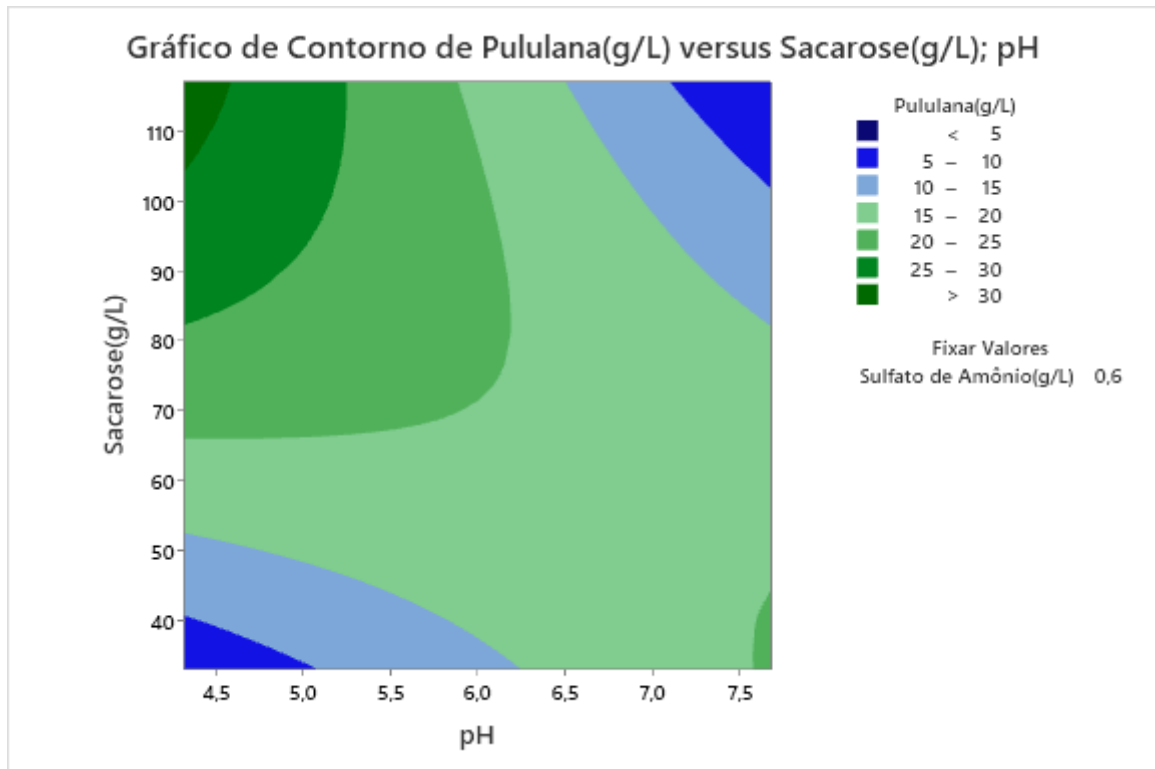
Fonte: Autoria Própria (2021)

Utilizando um nível de confiança de 95%, apenas os fatores pH, pH*Sacarose e Sulfato de Amônio*Sulfato de Amônio, atingiram a linha de confiança de 95%, indicando que esses fatores são significativos e influenciam na produção de pululana com 95% de confiança. Pode-se notar que o fator sacarose também pode ser considerado significativo se remover um pouco da expressão do nível de confiança necessária no experimento.

5.1.1.3 Gráficos de Contorno

Os gráficos de contorno foram realizados aos pares das 3 variáveis estudadas, fixando a outra variável no ponto central do estudo. A seguir são mostrados os 3 gráficos de contorno da produção de pululana:

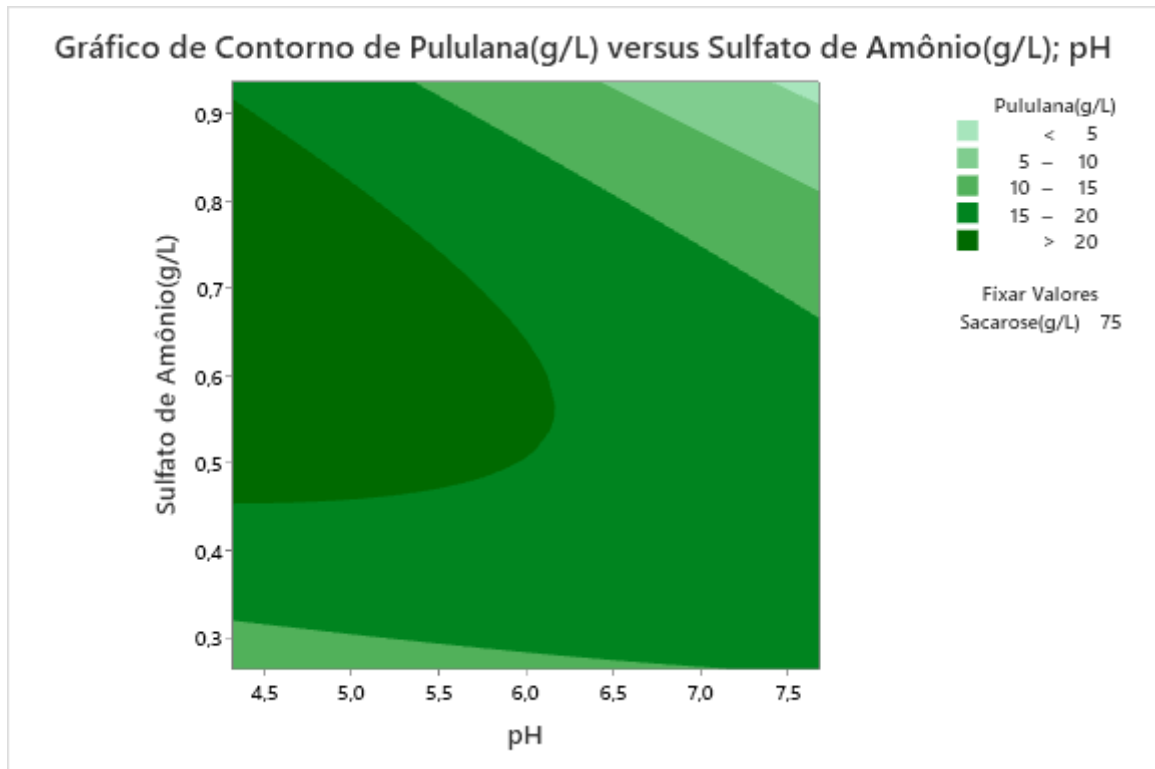
Gráfico 3 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando o sulfato de amônio



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 3, apresenta o gráfico de contorno fixando o sulfato de amônio em 0,6g/L e variando a sacarose e pH. Esse gráfico mostra que para ser produzida mais pululana deve-se utilizar os parâmetros em níveis dentro da área do canto superior esquerdo que são apresentadas em coloração verde escuro. Esta área compreende as variáveis de estudo nas faixas de pH menores que 4,5 e sacarose com concentração igual ou superior a 110g/L. Esse gráfico só é confiável dentro do intervalo apresentado, mostrando que seria necessário um novo estudo em níveis de pH menores que 4,5 e sacarose com níveis de concentração acima de 110g/L para verificar se a tendência do gráfico continua a aumentar o valor de pululana produzida.

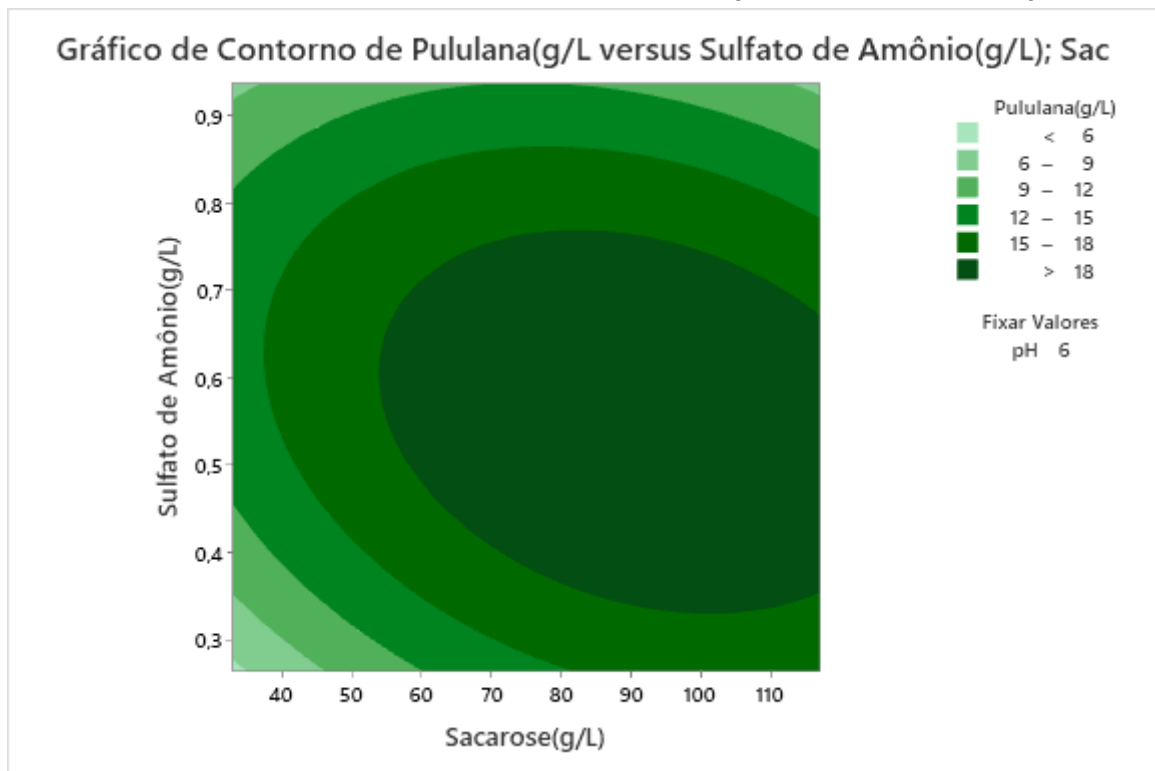
Gráfico 4 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando a sacarose



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 4, apresenta o gráfico de contorno onde o valor de sacarose é fixo em 75g/L, valor médio da faixa estudada, e o que varia é o pH e a concentração de sulfato de amônio na faixa estudada. Esse gráfico mostra maior produção de pululana em pH entre 4,6 e 6,0 e Sulfato de amônio entre 0,5g/L e 0,6g/L a depender do pH para outras faixas.

Gráfico 5 - Gráfico de Contorno de Pululana da cepa CCT 4154 fixando o pH



Fonte: Autoria Própria (2021)

Já o gráfico 5 mostra o gráfico de contorno fixando o pH em 6 e variando a concentração de sulfato de amônio e de sacarose nessa faixa de estudo. Esse gráfico apresenta um comportamento circular e prediz a maior produção de pululana na área mais escura com sacarose entre 60g/L e próximo a 110g/L, e sulfato de amônio próximas a 0,4g/L e 0,7g/L, considerando pH fixo em 6.

Os 3 gráficos de contorno confirmam o resultado do nível dos parâmetros obtidos na solução inicialmente, e ainda sugerem que para melhorar ainda mais a produção de pululana deve-se testar faixas de pH menores que 4,30 e testar faixas de sacarose maiores que 110g/L.

5.1.2 Produção de Biomassa pela cepa CCT 4154

Foi avaliada no mesmo experimento a produção de biomassa celular pela cepa CCT 4154.

5.1.2.1 Solução para produção máxima de biomassa

Com os dados experimentais, foi extraído do software as melhores condições para a produção de biomassa celular, nas faixas das variáveis utilizadas neste estudo. Essas condições estão disponíveis a seguir, na figura 5:

Figura 5 - Otimização biomassa máxima da cepa CCT 4154

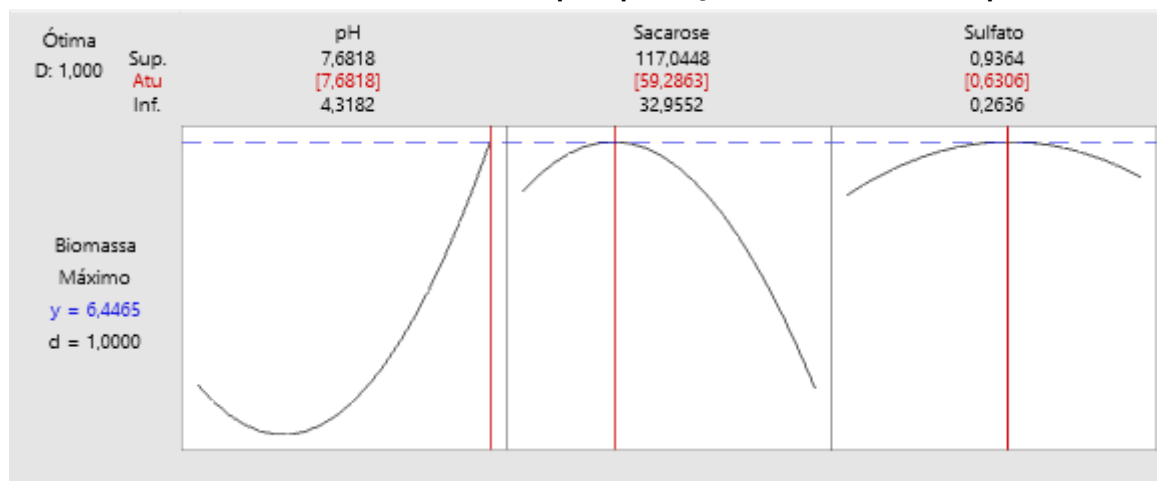
Solução

Solução	pH	Sacarose(g/L)	Sulfato de Biomassa(g/L) Amônio(g/L)	Desirability	
				Ajuste	Composta
1	7,68179	59,2863	0,630578	6,44655	1

Fonte: Autoria Própria (2021)

A solução prediz uma produção máxima de biomassa de 6,45 g/L, se utilizássemos um cultivo celular de pH 7,68, com 59,29 g/L de sacarose, e 0,63 g/L de sulfato de amônio. Se compararmos com os parâmetros de produção máxima de pululana, os valores são bem diferentes, com exceção do sulfato de amônio que apresentou concentração muito similar ao do ponto ótimo da pululana.

Gráfico 6 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de biomassa da cepa CCT 4154



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 6 apresenta os gráficos das 3 variáveis otimizadas, onde o pH atingiu o melhor valor no ponto máximo do estudo, na ponta de uma possível parábola do gráfico, já a sacarose atingiu melhor valor no meio de uma parábola invertida, indicando que se o comportamento fosse extrapolado para outras faixas, esse ainda seria

o melhor valor para a sacarose, e o sulfato de amônio atingiu o melhor valor no meio de uma parábola ou outra função bem aberta, onde os valores não mudam tanto nesta faixa de estudo. Esta figura pode indicar que seriam necessários novos estudos com relação ao pH para avaliar o comportamento da biomassa em pH maior que 7,68.

5.1.2.2 Análise do modelo e Gráfico de Pareto

O modelo obtido através dos dados experimentais com relação a resposta de biomassa, resultou em um modelo de R^2 igual a 71,69% como mostra a figura 6:

Figura 6 - Modelo do delineamento de biomassa com a cepa CCT 4154

Sumário do Modelo

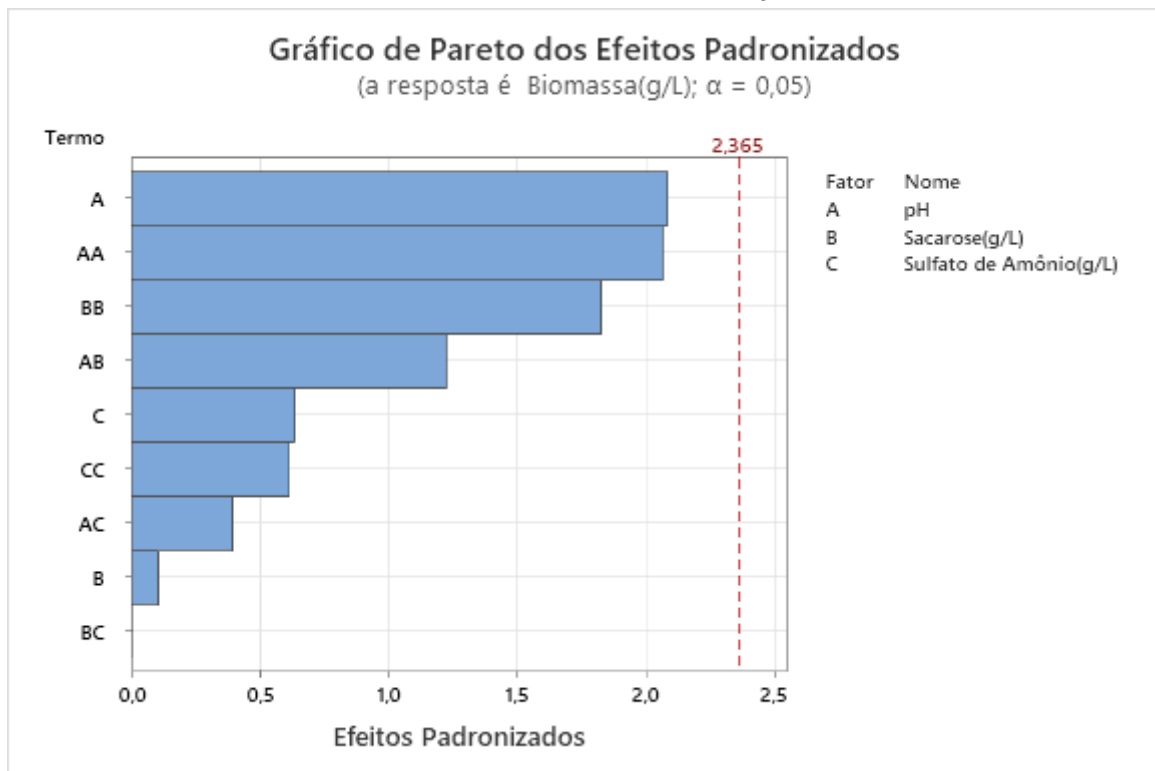
S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,538498	71,69%	35,29%	0,00%

Fonte: Aatoria Própria (2021)

Esse modelo apresentou R^2 inferior ao modelo de pululana, mas ainda assim, por ser um experimento biológico, pode ser considerado para estudos futuros.

O gráfico de Pareto, disposto no gráfico 7, apresenta as variáveis significativas na produção de biomassa utilizando um nível de confiança de 95%:

Gráfico 7 - Pareto de biomassa com a cepa CCT 4154



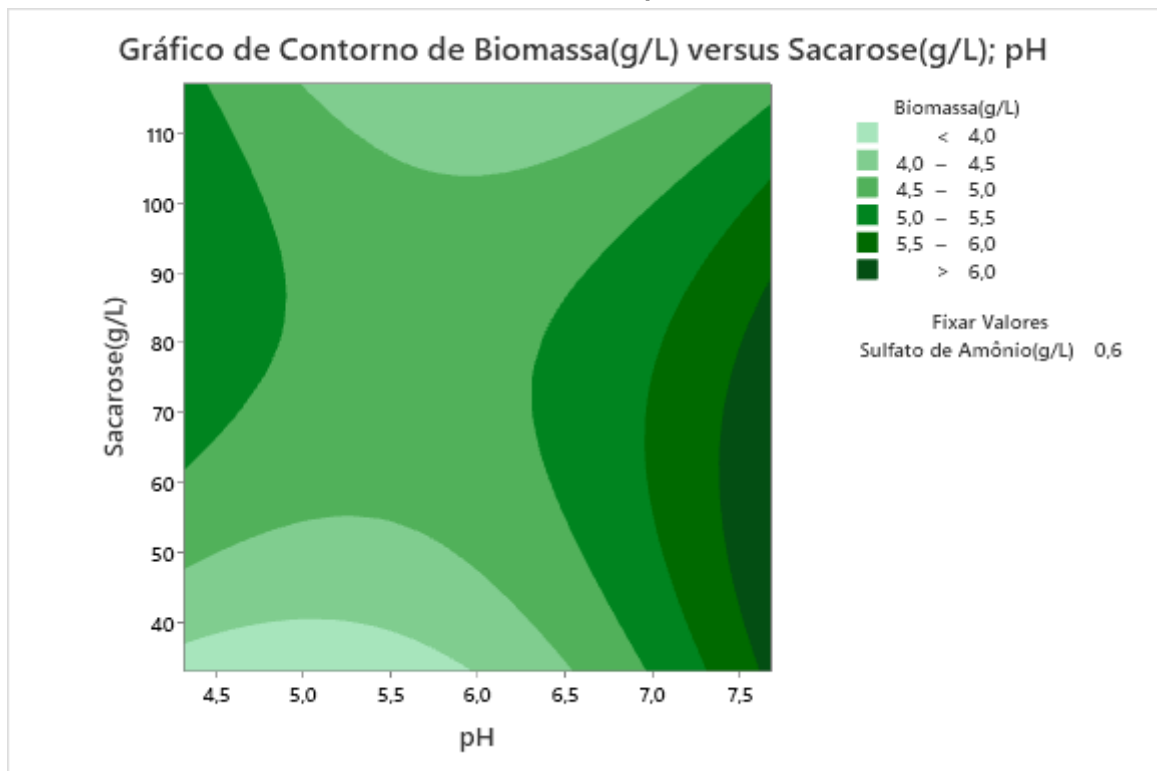
Fonte: Autoria Própria (2021)

Observa-se no gráfico de pareto que nenhuma das variáveis foi considerada significativa neste intervalo de confiança, embora os fatores pH e pH*pH poderiam ser considerados significativos se o nível de confiança aplicado fosse de 80%. Isso indica que as variáveis não influenciam tanto nessa faixa de estudo, porém ainda pode-se dizer que o pH exerce maior influência sobre a produção de biomassa celular, se comparado com as outras variáveis estudadas.

5.1.2.3 Gráficos de Contorno

Os gráficos de contorno da biomassa foram gerados a partir dos dados experimentais da mesma forma dos gráficos de contorno da produção de pululana, ou seja, foram realizados aos pares das 3 variáveis, fixando a terceira variável no ponto central da faixa estudada. Os gráficos são apresentados a seguir:

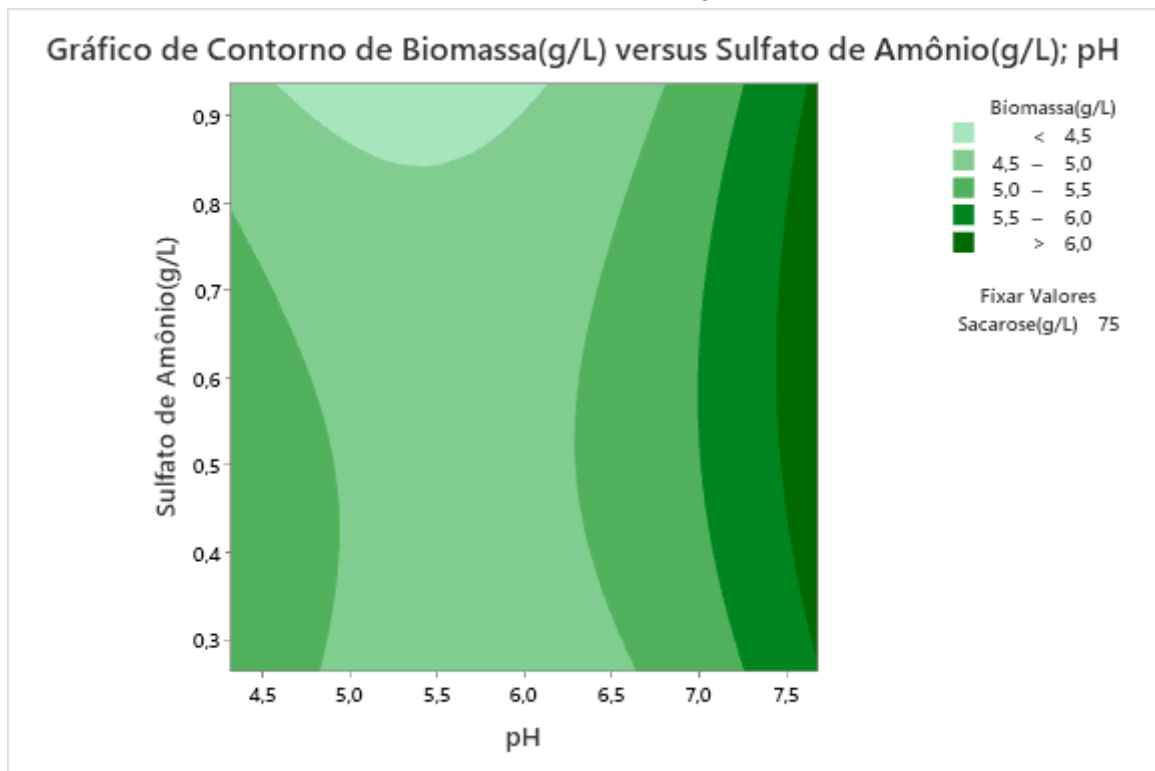
Gráfico 8 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando o sulfato de amônio



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico de contorno do gráfico 8 prediz os níveis de biomassa que podem ser produzidos em cada combinação de sacarose e pH inicial, fixando o sulfato de amônio em 0,6g/L. Esse gráfico indica um comportamento com dois lados opostos com produção maior de biomassa, apresentados em verde escuro e 2 lados com produção bem baixa (apresentados em verde claro). Analisando o gráfico a melhor área para produção de biomassa, que produziria acima de 6 g/L de biomassa, estaria em pH acima de 7,5 e sacarose entre 80 g/L e 40 g/L, mas como é uma área na extremidade do gráfico, necessitam novos estudos, principalmente com relação ao pH inicial, necessitando ser estudado em faixas acima de 7,5.

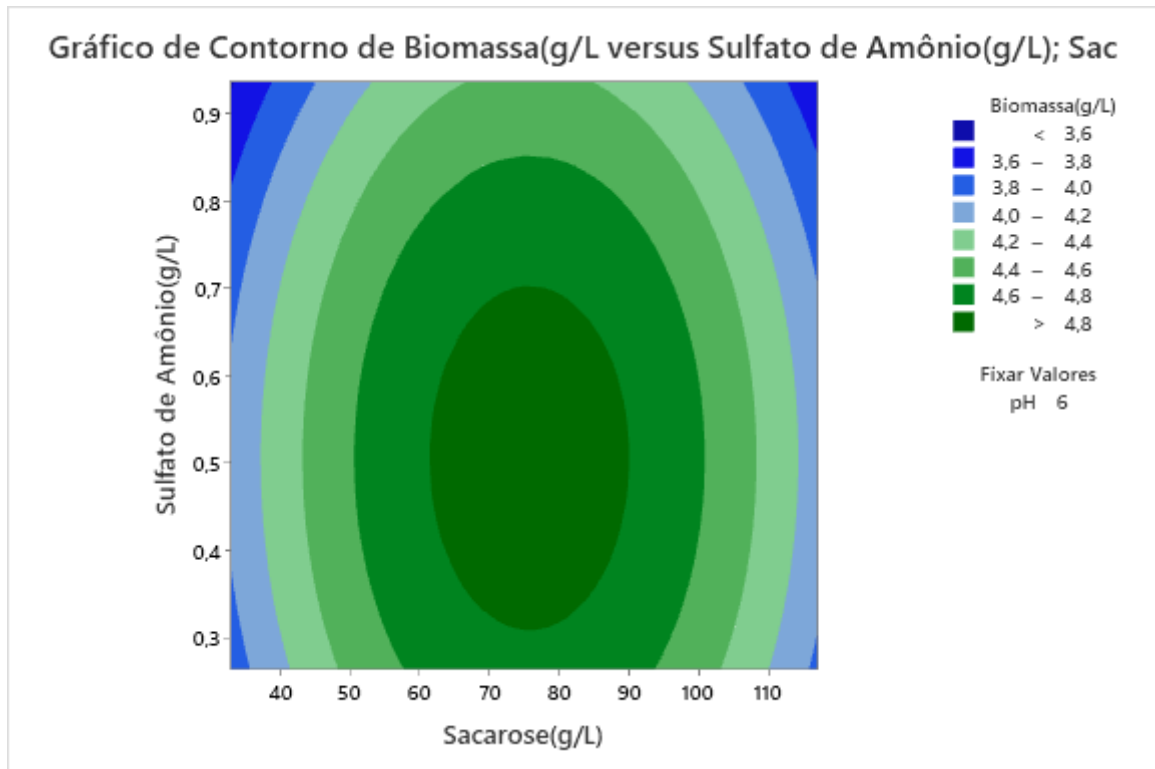
Gráfico 9 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando a sacarose



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 9 mostra o gráfico de contorno utilizando agora a sacarose fixa em 75 g/L, e variando o pH e a concentração de sulfato de amônio nas faixas de estudo. Esse gráfico prediz uma baixa produção de biomassa em pH entre 5 e 6,5 além de apresentar uma melhor produção em pH acima de 7,5 como mostrado no gráfico de contorno anterior, com uma produção acima de 6 g/L de biomassa. Esse gráfico ainda indica a baixa influência da concentração de sulfato de amônio na produção de biomassa, apresentando um gráfico de linhas que se assemelham a colunas, o que mostra a baixa significância desta variável, se comparado ao pH.

Gráfico 10 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa CCT 4154 fixando o pH



Fonte: Aatoria Própria (2021)

No gráfico de contorno, do gráfico 10, o pH é fixo em 6,0 enquanto a concentração de sacarose e de sulfato de amônio são variadas no intervalo de estudo. Esse gráfico aparenta faixas circulares que tendem para o meio das faixas de estudo, entre 70 g/L e 80 g/L de sacarose e de 0,4 g/L e 0,6 g/L de sulfato de amônio, onde apresentariam os maiores valores de biomassa em pH 6, produzindo acima de 4,8 g/L, que é um valor inferior aos dos gráficos de contorno anteriores, pois em pH 6 se prediz não produzir muita biomassa quanto em outros níveis de pH.

A predição dos 3 gráficos de contorno confirma a maior significância do pH em relação às outras variáveis na produção de biomassa.

5.2 Cepa B

A otimização utilizando a cepa B não apresentou bons resultados de preditibilidade em relação à produção de pululana. Apresentando um R^2 próximo de 50%, não foi um bom resultado, sendo necessária a necessidade de repetir o experimento para atingir melhores resultados. O experimento não foi refeito devido à falta de tempo útil e além do fato da cepa utilizada ter apresentado sinais de perda da capacidade de produzir o exopolissacarídeo nos experimentos subsequentes, podendo ser alguma

característica desconhecida desta cepa não identificada ou algum outro parâmetro fermentativo adverso.

Já para a produção de biomassa, o modelo foi mais preditivo, apresentando R^2 próximo a 80%, o que pode ser útil para base de estudo de trabalhos futuros.

A tabela do experimento DCCR, juntamente com as respostas obtidas experimentalmente para elaboração dos modelos pelo software, está apresentado na tabela 3:

Tabela 3 - Delineamento DCCR da cepa B com as respostas experimentais

Ensaio	pH Inicial	Sacarose(g/L)	Sulfato de Amônio(g/L)	Biomassa(g/L)	Pululana(g/L)
1	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)	2,56	7,64
2	5,00 (-1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)	3,62	7,12
3	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)	4,00	10,15
4	5,00 (-1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)	4,06	7,22
5	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,40 (-1)	5,44	3,98
6	7,00 (+1)	50,00 (-1)	0,80 (+1)	4,50	6,34
7	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,40 (-1)	4,20	13,72
8	7,00 (+1)	100,00 (+1)	0,80 (+1)	4,12	11,98
9	4,32 (-1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)	3,37	8,18
10	7,68 (+1,68)	75,00 (0)	0,60 (0)	5,13	7,52
11	6,00 (0)	33,00 (-1,68)	0,60 (0)	3,35	5,74
12	6,00 (0)	117,00 (+1,68)	0,60 (0)	3,47	4,59
13	6,00 (0)	75,00 (0)	0,264 (-1,68)	3,92	7,68
14	6,00 (0)	75,00 (0)	0,936 (+1,68)	3,37	5,63
15	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	3,64	11,90
16	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	4,64	8,59
17	6,00 (0)	75,00 (0)	0,60 (0)	3,30	5,18

Fonte: Autoria Própria (2021)

5.2.1 Produção de Pululana pela cepa B

O experimento de otimização realizado para a cepa B, apresentou valores de concentração de pululana similares ao do estudo de Oliveira (2010), que utilizou a cepa *Aureobasidium Pullulans* IOC 3467.

Mas, como discutido anteriormente, o modelo produzido pelos dados experimentais com a cepa B, não foi tão preditivo, então optou-se por discutir este modelo de forma mais resumida, não utilizando gráficos de contorno que poderiam apresentar muitos erros na predição.

5.2.1.1 Solução para concentração máxima de Pululana

Utilizando este modelo, a solução encontrada que prediz maior produção de pululana nesta fermentação, é mostrada na figura 7:

Figura 7 - Otimização pululana máxima da cepa B

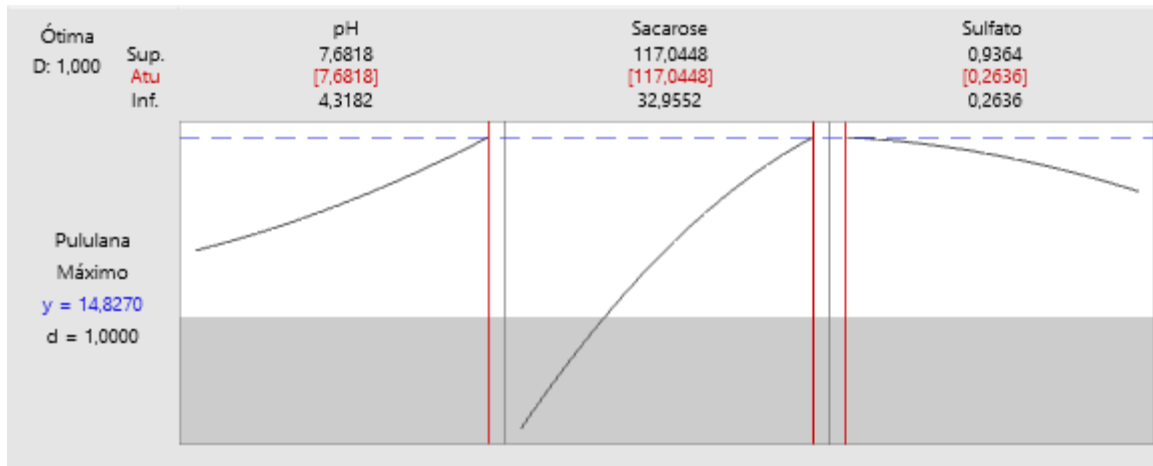
Solução

Solução	pH	Sacarose(g/L)	Sulfato de Pululana(g/L) Amônio(g/L)	Desirability Ajuste Composta
1	7,68179	117,045	0,263641	14,8270

Fonte: Aatoria Própria (2021)

Esta solução nos apresenta uma predição onde seriam produzidos cerca de 14,83 g/L de pululana, utilizando as variáveis de cultivo em pH 7,68, sacarose 117,05 g/L além de 0,26g/L de sulfato de amônio. Apenas a concentração de sacarose otimizada foi igual ao experimento utilizando a cepa americana, e com menos da metade da produção da cepa CCT 4154. Esses parâmetros, com excessão da sacarose são diferentes com relação a literatura, podendo ser explicada devido ao fato da cepa utilizada apresentar parâmetros diferentes das cepas presentes na literatura.

Gráfico 11 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de pululana da cepa B



Fonte: Autoria Própria (2021)

Os gráficos, demonstrados no gráfico 11, demonstram o comportamento da produção de pululana, na faixa de estudo das 3 variáveis avaliadas, onde o pH apresentou uma curva crescente que demonstra que quanto maior o pH maior seria a produção de pululana no intervalo de estudo, de modo quase contrário ao da cepa americana. Já a sacarose apresenta o mesmo comportamento crescente, mas de forma mais acentuada, indicando maior significância no resultado que o pH neste modelo. Enquanto o sulfato de amônio apresentou as menores variações da produção de pululana quando seu valor é alterado, diminuindo levemente a produção quando seu valor é aumentado.

5.2.1.2 Análise do Modelo e Gráficos de Pareto

O modelo produzido a partir dos dados experimentais apresentou um R^2 de 49,12% como mostra a figura 8:

Figura 8 - Modelo do delineamento de pululana com a cepa B

Sumário do Modelo

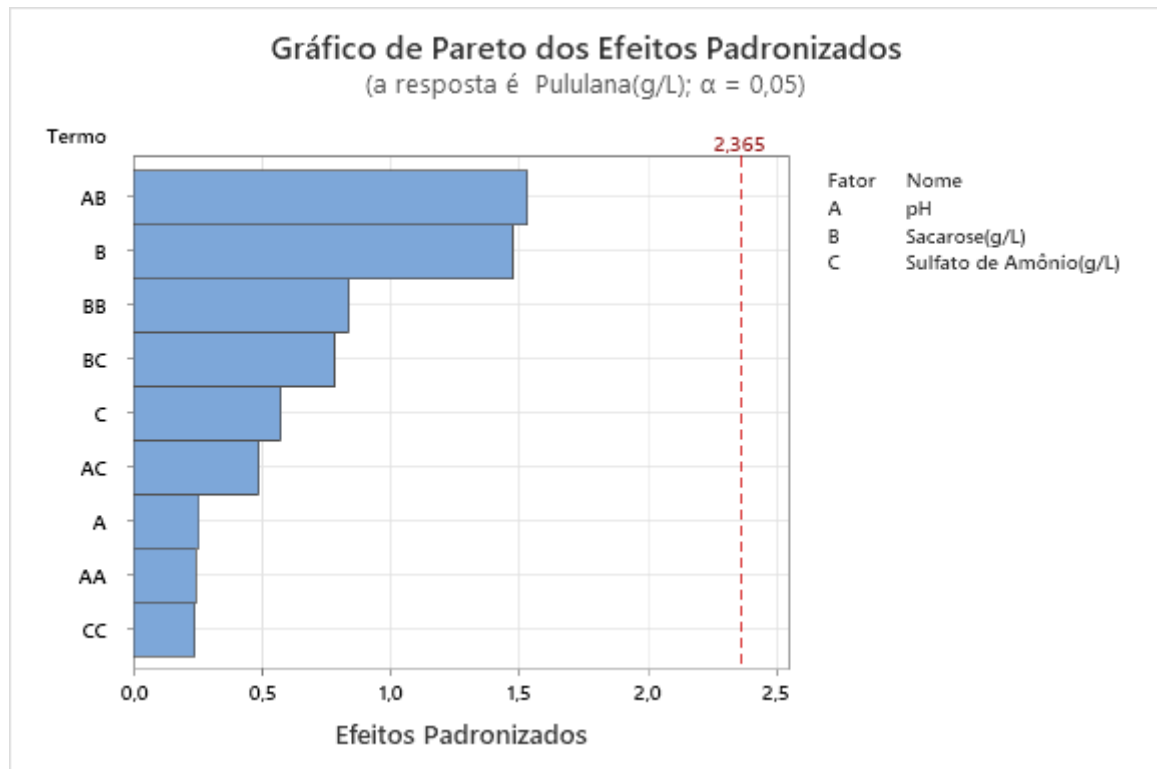
S	R2	R2(aj)	R2(pred)
2,94496	49,13%	0,00%	0,00%

Fonte: Autoria Própria (2021)

Como discutido no início, esse resultado não foi satisfatório, pois apresentou um R^2 muito baixo, sendo considerado assim um modelo pouco preditivo.

O gráfico de Pareto, mostrado no gráfico 12, apenas confirma o problema do modelo, que utilizando um nível de confiança de 95%, nenhuma variável atingiu nível de significância:

Gráfico 12 - Gráfico de Pareto de Pululana com a cepa B



Fonte: Autoria Própria (2021)

A significância dos fatores pH*Sacarose e Sacarose, atingiu valor significativo apenas se o nível de confiança fosse de 60%, algo que seria muito baixo. Assim confirmando a necessidade de refazer o experimento para produzir um novo modelo.

5.2.2 Produção de Biomassa pela cepa B

No caso do modelo para produção de biomassa, foi mais preditivo e superior até ao modelo de produção de biomassa da cepa CCT 4154, indicando R^2 próximo a 80%.

5.2.2.1 Solução para produção máxima de biomassa celular

A solução encontrada pelo software para melhor produção de biomassa, e desta forma maior crescimento celular está disposta na figura 9:

Figura 9 - Otimização biomassa máxima da cepa B

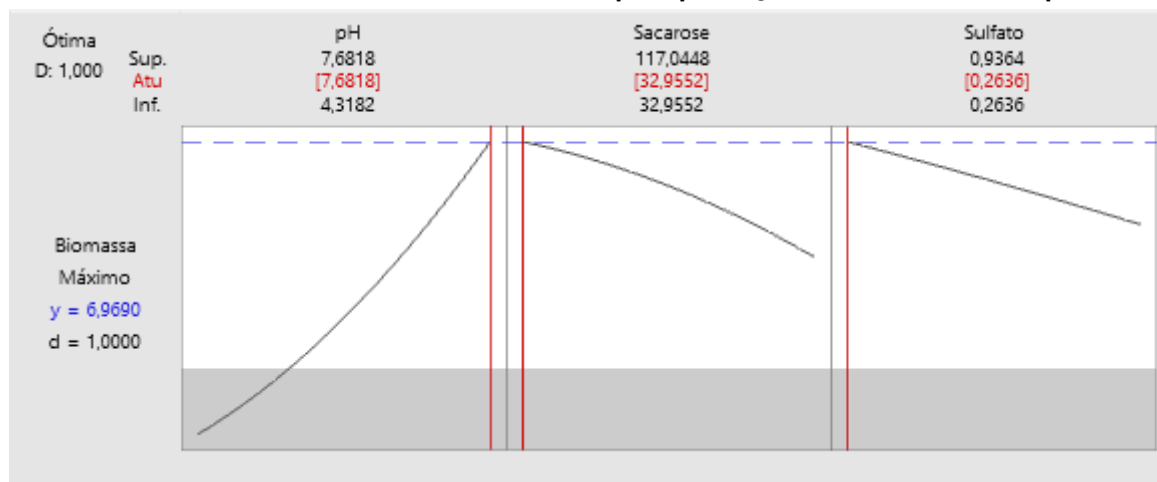
Solução

Solução	pH	Sulfato de Biomassa(g/L)		Desirability Ajuste	Composta
		Sacarose(g/L)	Amônio(g/L)		
1	7,68179	32,9552	0,263641	6,96899	1

Fonte: Autoria Própria (2021)

O modelo prediz um nível maior de biomassa de cerca de 6,97 g/L utilizando as variáveis pH em 7,68 , sacarose em 32,96 g/L e sulfato de amônio em 0,26 g/L. Comparando esses valores com a produção de pululana desta cepa o que varia mesmo é a sacarose que muda do valor máximo para o valor mínimo, e se comparada a produção de biomassa da cepa americana, apenas o pH é igual, demonstrando que este microrganismo tem maior produção de biomassa em pH inicial igual ou superior a 7,68, necessitando estudos em níveis de pH inicial maiores para comparação.

Gráfico 13 - Variáveis nas faixas de estudo para produção de biomassa da cepa B



Fonte: Autoria Própria (2021)

Como mostra o gráfico 13, o pH inicial nesta faixa de estudo apresenta forte influência na produção de biomassa, aumentando rapidamente a produção de biomassa à medida que o pH é aumentado até o limite do estudo com pH de 7,68. Já a sacarose e o sulfato de amônio apresentam influências semelhantes nas suas faixas de estudo, onde diminuem a produção de biomassa levemente quando tem suas concentrações aumentadas no cultivo.

5.2.1.2 Análise do Modelo e Gráficos de Pareto

O modelo gerado a partir dos dados experimentais apresentou um R^2 de 78,41% como mostrado da figura 10:

Figura 10 - Modelo do delineamento de biomassa com a cepa B

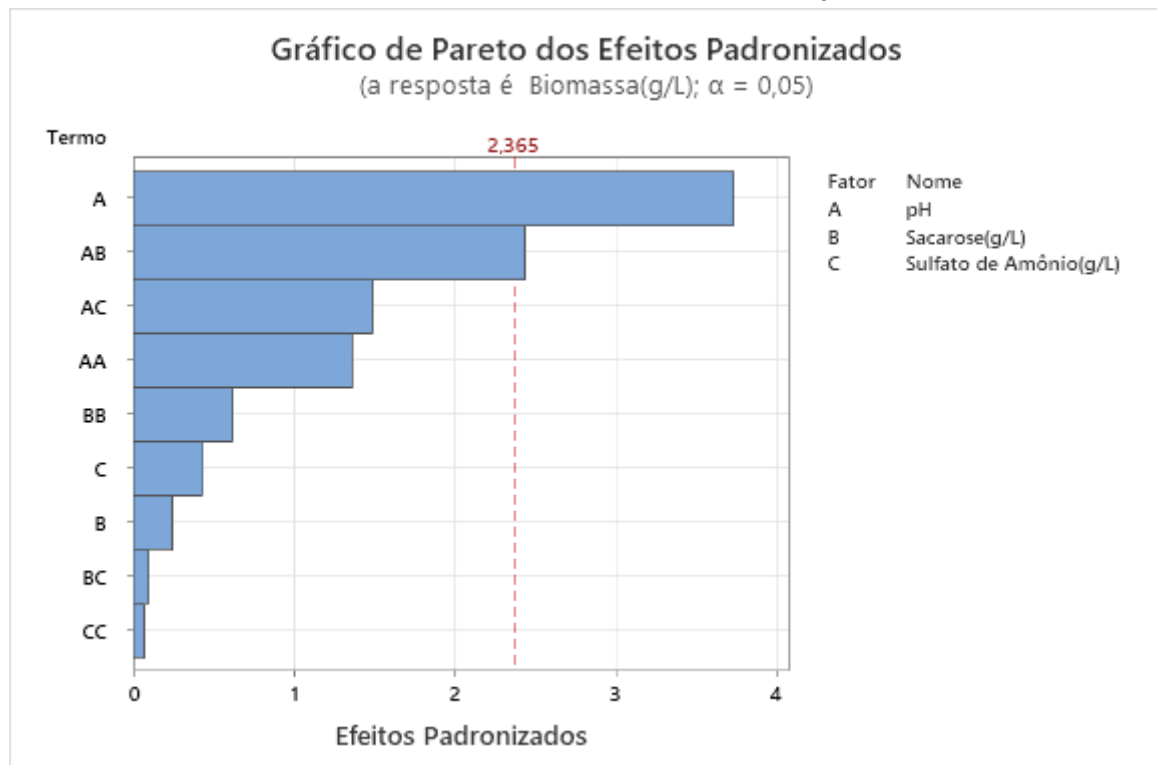
Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,505715	78,41%	50,66%	0,00%

Fonte: Autoria Própria (2021)

Esse R^2 para um experimento microbiológico, tem preditibilidade boa, podendo ser utilizado como base para estudos futuros. O gráfico de pareto, apresentado no gráfico 14, mostra as variáveis significativas do modelo, com confiança de 95%:

Gráfico 14 - Pareto de biomassa com a cepa B



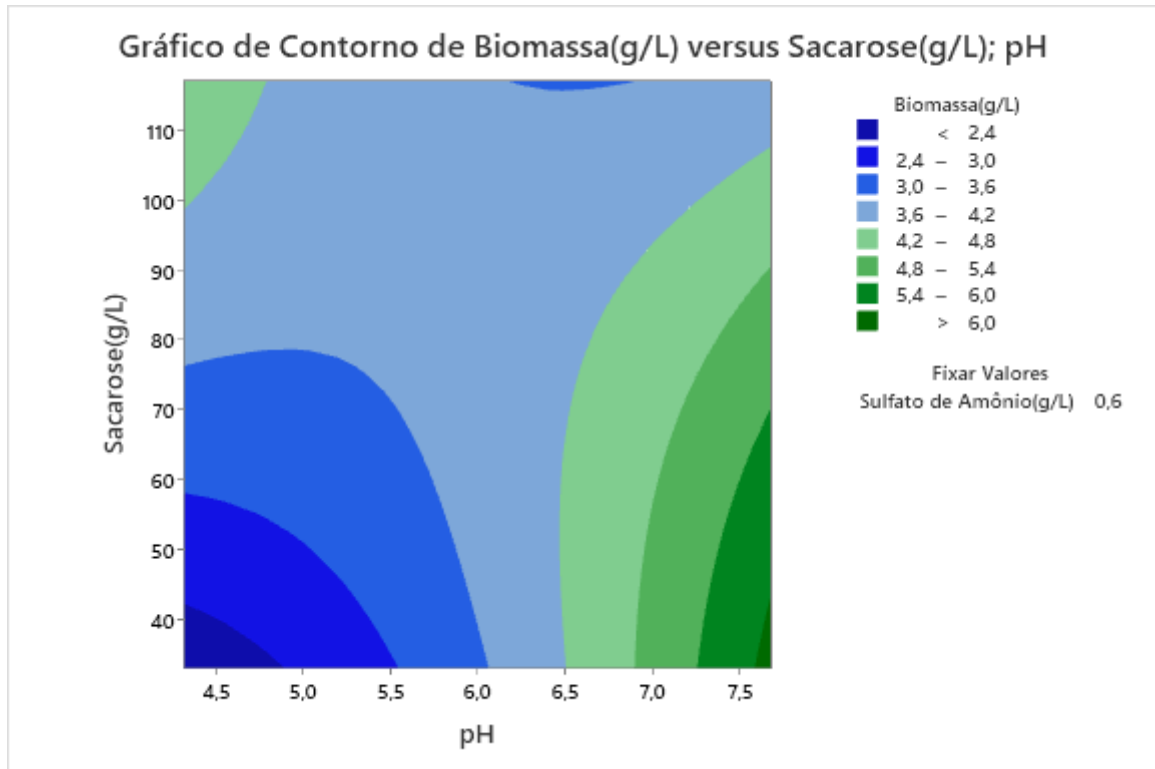
Fonte: Autoria Própria (2021)

Analisando o gráfico 14, o pH e o fator pH*Sacarose foram fatores significativos do modelo considerando o nível de confiança de 95%, indicando que são importantes e afetam na resposta de produção de biomassa.

5.1.1.3 Gráficos de Contorno

Foram extraídos 3 gráficos de contorno a partir do modelo produzido, utilizando as 3 variáveis aos pares umas com as outras, fixando o valor da outra variável no ponto central das faixas de estudo.

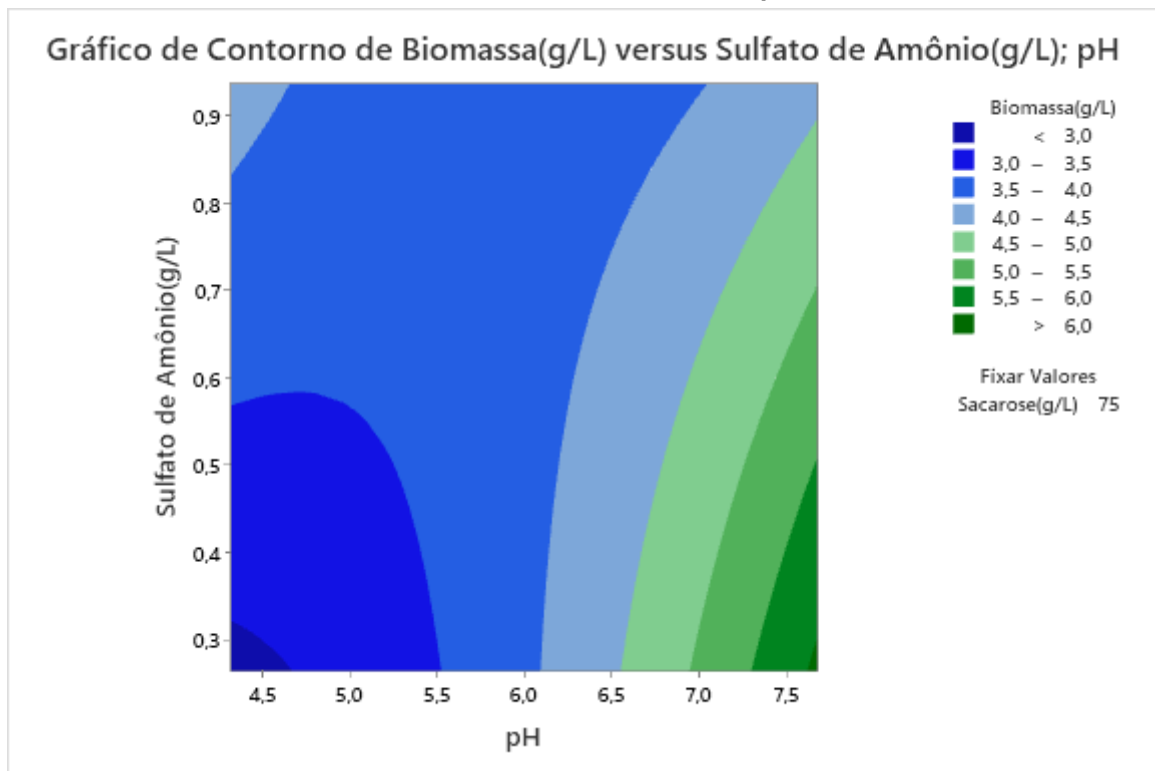
Gráfico 15 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando o sulfato de amônio



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico de contorno, apresentado no gráfico 15, utiliza a variável sulfato de amônio fixada em 0,6 g/L, predizendo maior produção de biomassa no canto inferior direito em verde escuro, situado em pH acima de 7,5 e sacarose próxima a 40 g/L para uma produção de biomassa superior a 6 g/L.

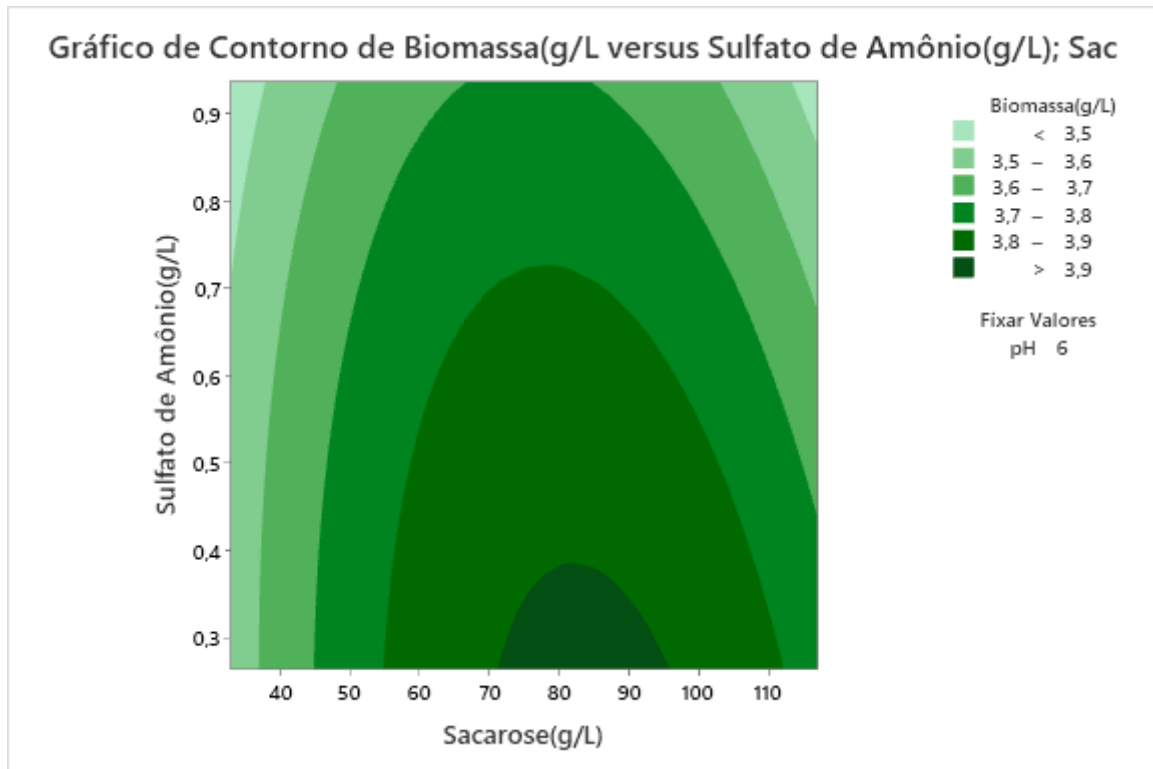
Gráfico 16 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando a sacarose



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico de contorno, do gráfico 16, apresentado anteriormente, utiliza a variável sacarose fixada em 75 g/L e analisando as variáveis pH e sulfato de amônio em suas faixas de estudo. Este gráfico de contorno também prediz maior produção de biomassa no canto inferior direito, onde o pH é próximo de 7,5 e o sulfato de amônio pode variar entre 0,3 e 0,5g/L para uma produção de biomassa superior a 6,0 g/L. Com os dois gráficos confirma-se a importância de um pH acima de 7,5 para maior produção de biomassa, sendo necessário novos estudos para analisar a influência de faixas de pH acima de 7,68, valor limite deste estudo.

Gráfico 17 - Gráfico de Contorno de biomassa da cepa B fixando o pH



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 17 fixa o pH em 6, analisando as variáveis sacarose e sulfato de amônio em suas faixas de estudo. Neste gráfico o maior valor que pode ser obtido é acima de 3,9 g/L muito inferior aos outros gráficos, mostrando a forte influência do pH nesta resposta. O gráfico prediz como melhor valor a sacarose entre 70 g/L e 95 g/L enquanto o sulfato de amônio estaria entre 0,3 g/L e 0,4 g/L, mas que são confirmados nos gráficos anteriores utilizando a linha de pH em 6,0 como referência.

Os 2 primeiros gráficos desta resposta demonstram a necessidade de avaliar o pH em faixas acima de 7,68 além do segundo e terceiro gráficos sugerirem um estudo com faixas de sulfato de amônio com concentrações abaixo de 0,26 g/L.

5.3 Experimento Otimizado

Com os dados obtidos na otimização através do software Minitab, os parâmetros ideais nos intervalos de estudo das variáveis, foram utilizados para análise diária da produção de pululana e de biomassa, além da leitura de pH, Brix e a análise da viscosidade pelo viscosímetro.

Como na otimização foram abordados tanto a biomassa quanto a pululana em otimizações diferentes, optou-se pela utilização dos parâmetros otimizados para produção máxima da pululana. E devido ao fato de a cepa B apresentar resultados não satisfatórios, foi utilizado os parâmetros otimizados da cepa americana para as duas cepas.

Os resultados de produção de pululana ,devido à algum fator adverso como o estado das cepas, foram bem inferiores aos da etapa de otimização, não sendo produzida pululana no caso da cepa cearense, mas puderam servir de base para entender a evolução diária da produção de pululana e de biomassa, além de apresentar a correlação entre a concentração da pululana no meio fermentado e a viscosidade desse meio.

5.3.1 Análise diária cepa CCT 4154

A cepa CCT 4154, como citado anteriormente, apresentou valores bem inferiores da fase otimizada, mas foi possível analisar o perfil de evolução diariamente das respostas biomassa, pululana extraída, viscosidade, pH e Brix.

A tabela 4, apresenta as respostas obtidas de cada frasco diário, além do frasco de inóculo:

Tabela 4 - Respostas perfil diário da cepa CCT 4154

Amostra	Biomassa(g/L)	pH	Brix	Pululana(g/L)	Viscosidade
					(mPa.s em 30rpm)
Inóculo	1,57	4,32	11,80	0,85	Não analisada
24h	2,33	2,57	11,50	2,60	6,10
48h	3,51	2,46	11,30	7,50	13,40
72h	4,18	2,34	11,00	6,75	16,10
96h	5,30	2,42	10,90	12,02	18,70
120h	4,57	2,48	10,90	8,38	13,60

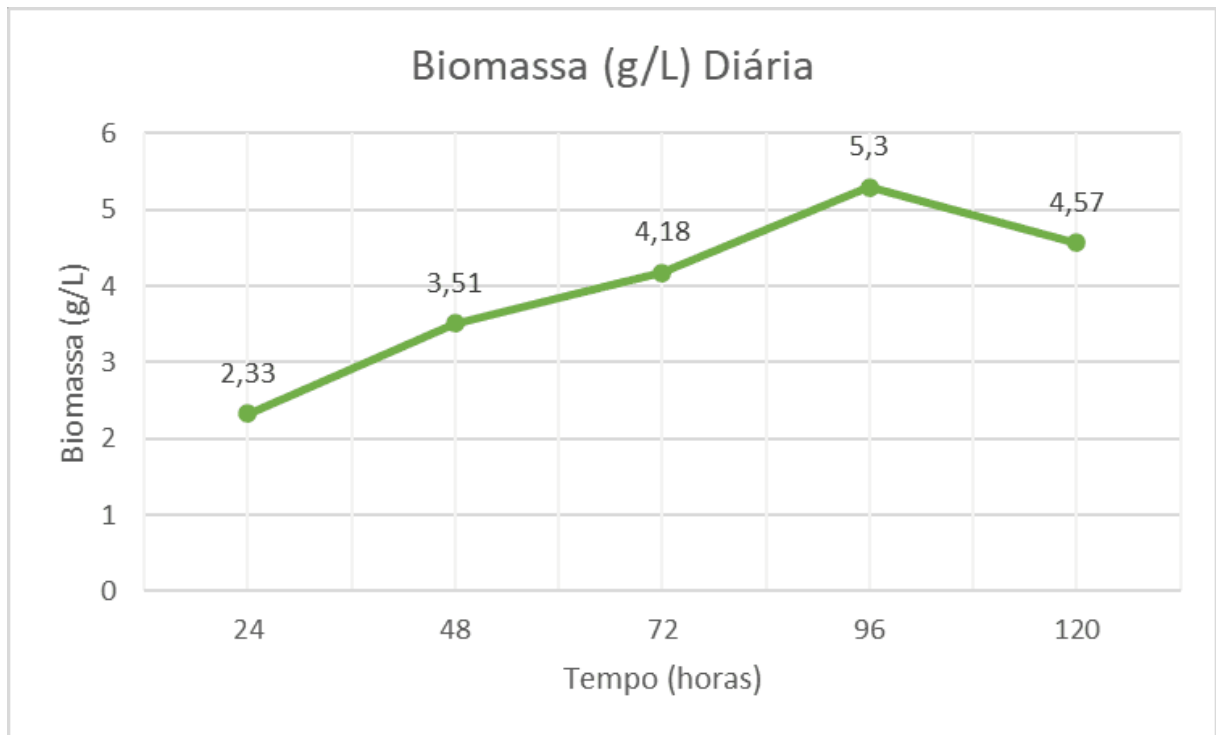
Fonte: Autoria Própria (2021)

A tabela mostra todos os dados obtidos durante esse experimento com as variáveis otimizadas, observando a evolução das respostas analisadas com o passar do tempo. A amostra de 120h apresentou resultados inferiores ao que se esperava

que acontecesse em todas as respostas, indicando algum possível problema com a inoculação ou mesmo de equipamentos.

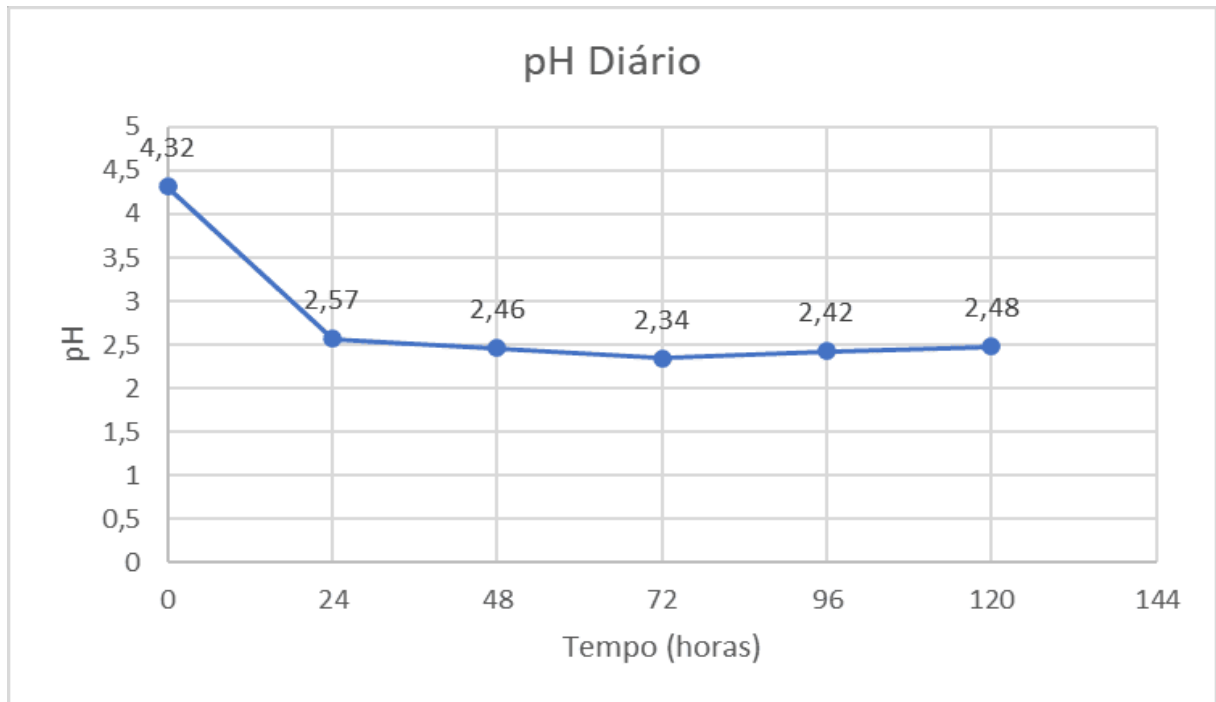
A diminuição da concentração de pululana e conseqüentemente da viscosidade em 96h para 120h de fermentação pode ser explicada pela atividade da enzima pululanase é induzida em baixos valores de pH (OLIVEIRA, 2010). Isso pode ter causado esse abaixamento, aliado ainda ao maior tempo de atividade dessa enzima.

Gráfico 18 - Evolução diária da biomassa utilizando a cepa CCT 4154



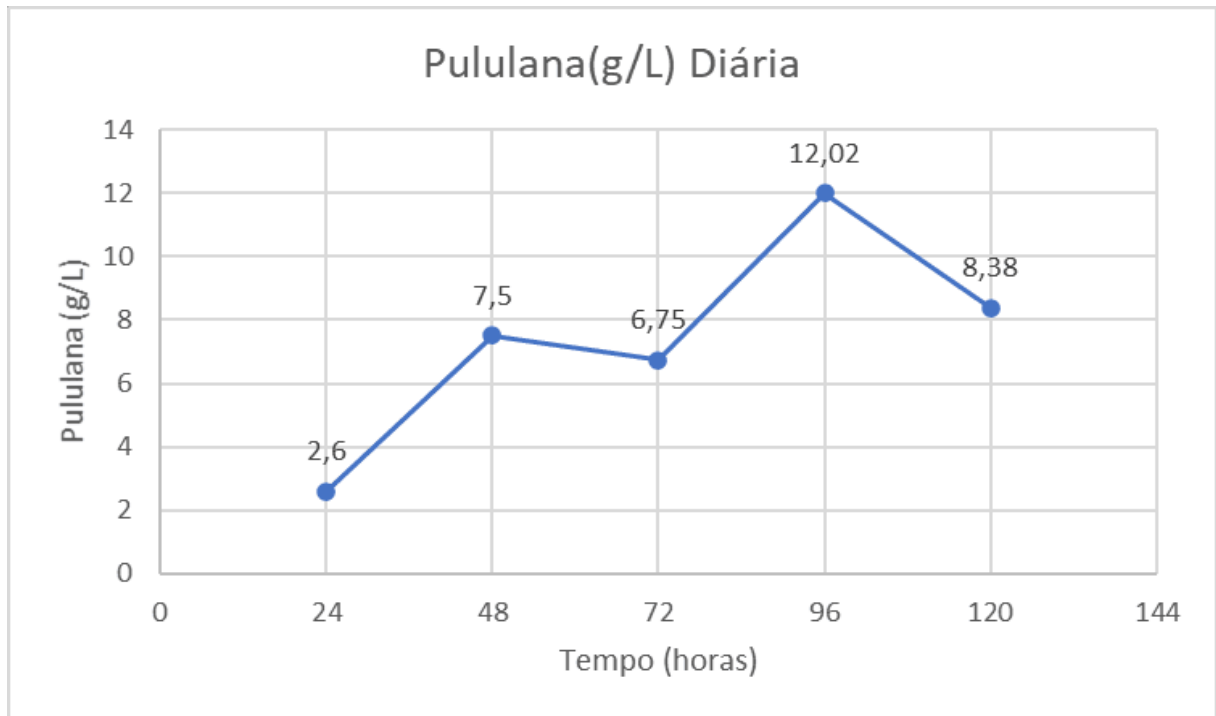
Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 18 apresenta o gráfico de evolução da biomassa com o tempo, apresentando comportamento quase constante até o período de 96h de fermentação. Utilizando a linha de tendência linear do período de 24h até 26h, obtêm-se a função $Biomassa(g/L) = 0,958t + 1,435$, onde t = tempo em horas, apresentando R^2 de 0,9899, mostrando que esta função representa bem o comportamento da produção de biomassa com o passar do tempo seguindo os parâmetros deste estudo. Serão necessários novos estudos para avaliar o comportamento para períodos de tempo maiores, considerando o erro relacionado à amostra de 120 horas, pois a produção com o passar do tempo pode diminuir, devido ao consumo do meio de cultivo pelo fungo.

Gráfico 19 - Evolução diária do pH utilizando a cepa CCT 4154

Fonte: Autoria Própria (2021)

Com relação ao pH, mostrado no gráfico 19, apresentou uma queda considerável em 24h passando de pH 4,32 para 2,57, mas depois manteve um comportamento de pH quase constante, podendo indicar que a produção de ácidos orgânicos foi diminuída neste nível de pH.

Gráfico 20 - Evolução diária da pululana utilizando a cepa CCT 4154

Fonte: Autoria Própria (2021)

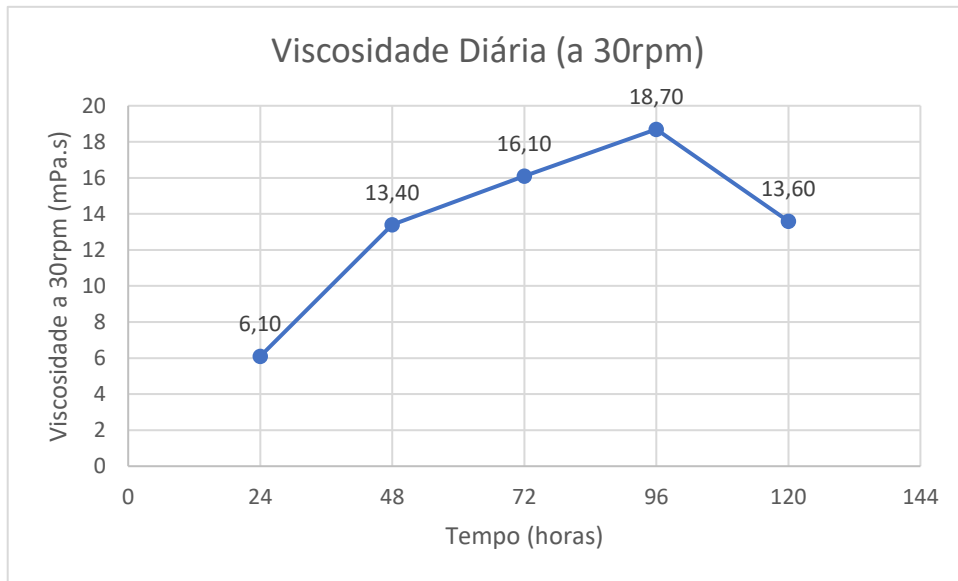
O gráfico de pululana, apresentado no gráfico 20, mostra a pululana extraída em cada frasco diário, mas que apresentou grande variação nos valores, mas no geral em aumento até o período de 96h de fermentação, apresentando até 96h uma linha de tendência com a função $Pululana(g/L) = 2,751t + 0,34$, onde $t = tempo(h)$, com R^2 de 0,8468 devido a queda no ponto de 72h.

Gráfico 21 - Evolução diária do grau Brix utilizando a cepa CCT 4154

Fonte: Autoria Própria (2021)

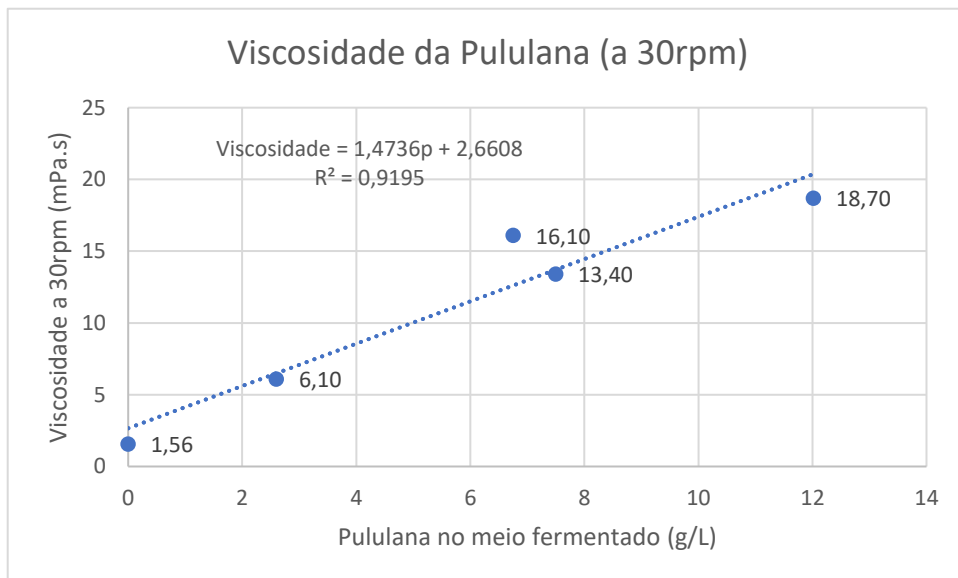
Com relação ao grau Brix, apresentado o gráfico 21, apresentou pequena queda, indicando baixo aproveitamento da sacarose, principal sólido solúvel do meio de cultivo.

A análise da viscosidade foi dividida em três gráficos, o primeiro com relação ao tempo de cultivo da amostra, o segundo foi avaliado em relação à concentração de pululana extraída no mesmo tempo de cultivo, formando uma curva padrão de viscosidade para a pululana produzida de forma fermentativa em um meio fermentado, enquanto o terceiro avaliou o comportamento da viscosidade do caldo fermentado de 96h (caldo de maior viscosidade a 30 rpm) em uma rampa de velocidades partindo de 0 rpm até 150rpm aumentando de 30 em 30 rpm a cada 60 segundos.

Gráfico 22 - Evolução diária da viscosidade utilizando a cepa CCT 4154

Fonte: Autoria Própria (2021)

Exibida no gráfico 22, a viscosidade aumentou consideravelmente de 24h para 48h, e continuou num ritmo constante menor até 96h onde atingiu o valor de 18,70 mPa.s, indicando a presença de pululana no meio.

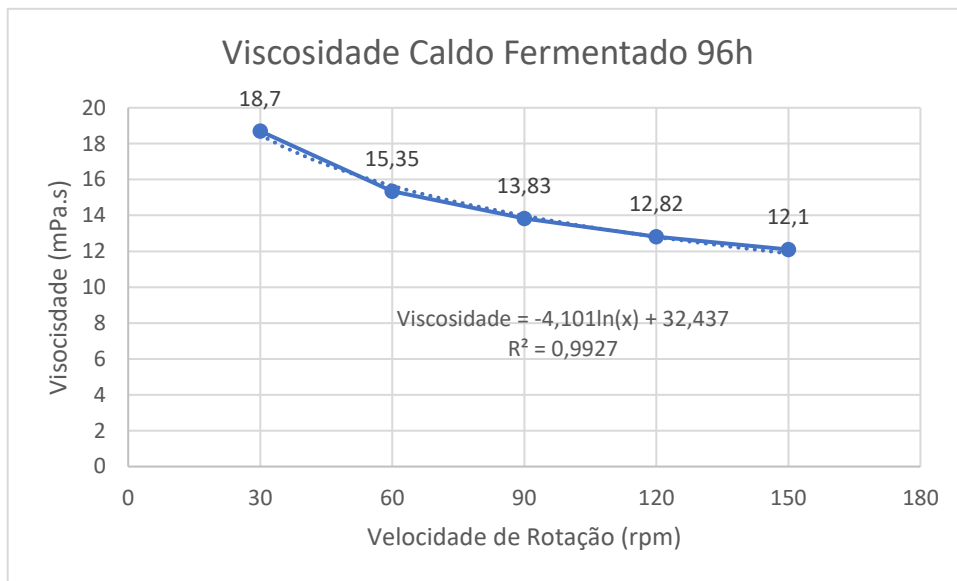
Gráfico 23 - Viscosidade do caldo fermentado em relação a pululana extraída da cepa CCT 4154

Fonte: Autoria Própria (2021)

No gráfico 23 foi utilizado uma linha de tendência do tipo linear para elaborar uma curva padrão para a pululana utilizando os dados obtidos. Foi inserido como viscosidade inicial o valor de 1,56 que foi analisado como a viscosidade do meio no

tempo 0h. Obtêm-se a equação $\text{Viscosidade} = 1,4736p + 2,6608$, onde p = concentração de pululana do meio fermentado em g/L, e viscosidade apresentada em mPa.s a 30 rpm. Essa equação pode ser utilizada para prever a pululana presente no meio de cultivo apenas analisando a viscosidade, evitando gastos exagerados de etanol, que é utilizado em volume de 2:1 de meio fermentado, além de evitar o tempo e energia gastos na secagem e pesagem do polímero extraído.

Gráfico 24 - Curva avaliando a viscosidade do caldo fermentado de 96h da cepa CCT 4154 variando a velocidade de rotação



Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico 24 apresenta o comportamento do fluido do caldo fermentado em diferentes velocidades de rotação, mostrando que o caldo fermentado na presença de maiores concentrações de pululana representado pelo caldo fermentado de 96h, comporta-se como um fluido pseudoplástico diminuindo a viscosidade à medida que a tensão de cisalhamento é aumentada. Esse comportamento pode ser descrito ainda pela fórmula $\text{Viscosidade} = -4,101 \ln(x) + 32,437$ onde x representa a velocidade de rotação em rpm e viscosidade é apresentada em mPa.s.

5.3.2 Análise diária cepa B

A cepa B devido a algum problema relacionado ao estado do microrganismo, não produziu pululana em concentração suficiente para ser extraída, mas assim como

a cepa CCT 4154, foram analisados diariamente, pH, grau Brix, concentração de biomassa, a própria concentração de pululana, além da viscosidade, que não variou muito devido à pouca ou nenhuma produção de pululana.

A tabela 5 apresenta todos os dados coletados das respostas obtidas:

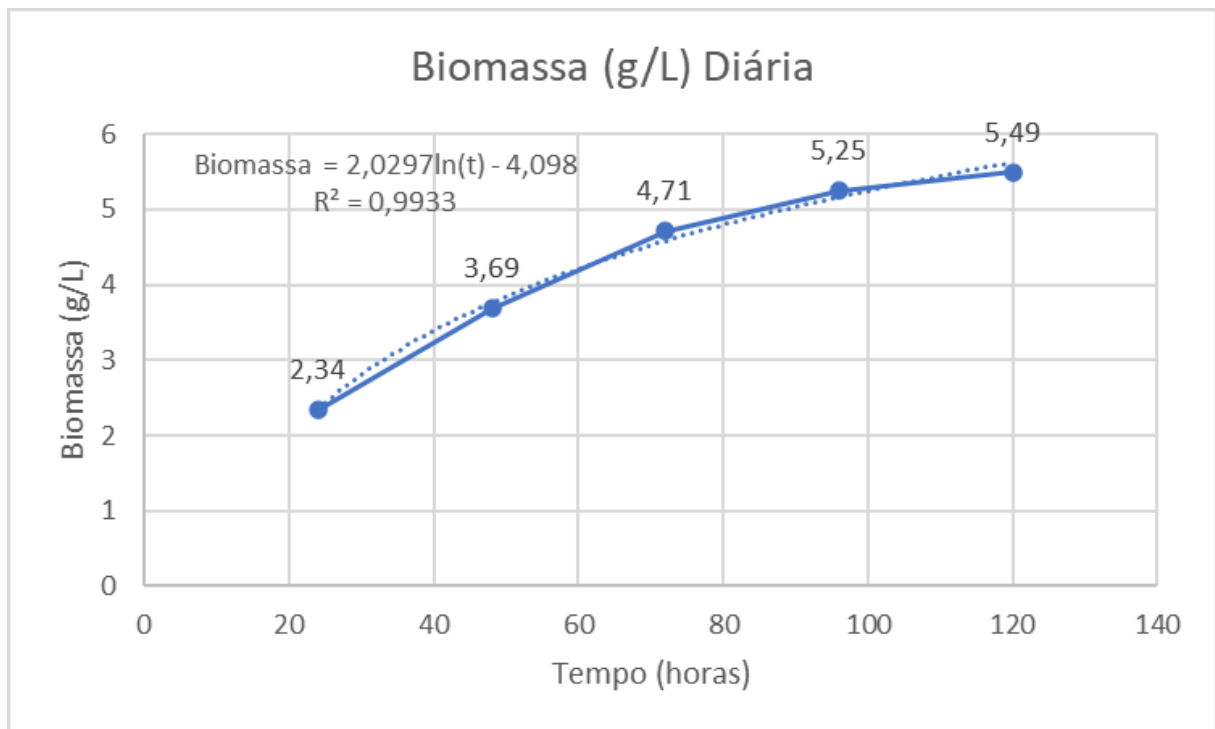
Tabela 5 - Respostas perfil diário da cepa B

Amostra	Biomassa(g/L)	pH	Grau Brix	Pululana (g/L)	Viscosidade
					(mPa.s em 30rpm)
Inóculo	1,73	4,32	11,80	0,23	Não analisada
24h	2,34	2,84	11,50	0,00	1,90
48h	3,69	2,45	11,50	0,00	2,10
72h	4,71	2,45	11,50	0,00	2,10
96h	5,25	2,44	11,50	0,00	2,30
120h	5,49	2,46	11,40	0,00	2,30

Fonte: Autoria Própria (2021)

Cada resposta será discutida em conjunto de seu gráfico de evolução diária, a seguir:

Gráfico 25 - Evolução diária da biomassa utilizando a cepa B



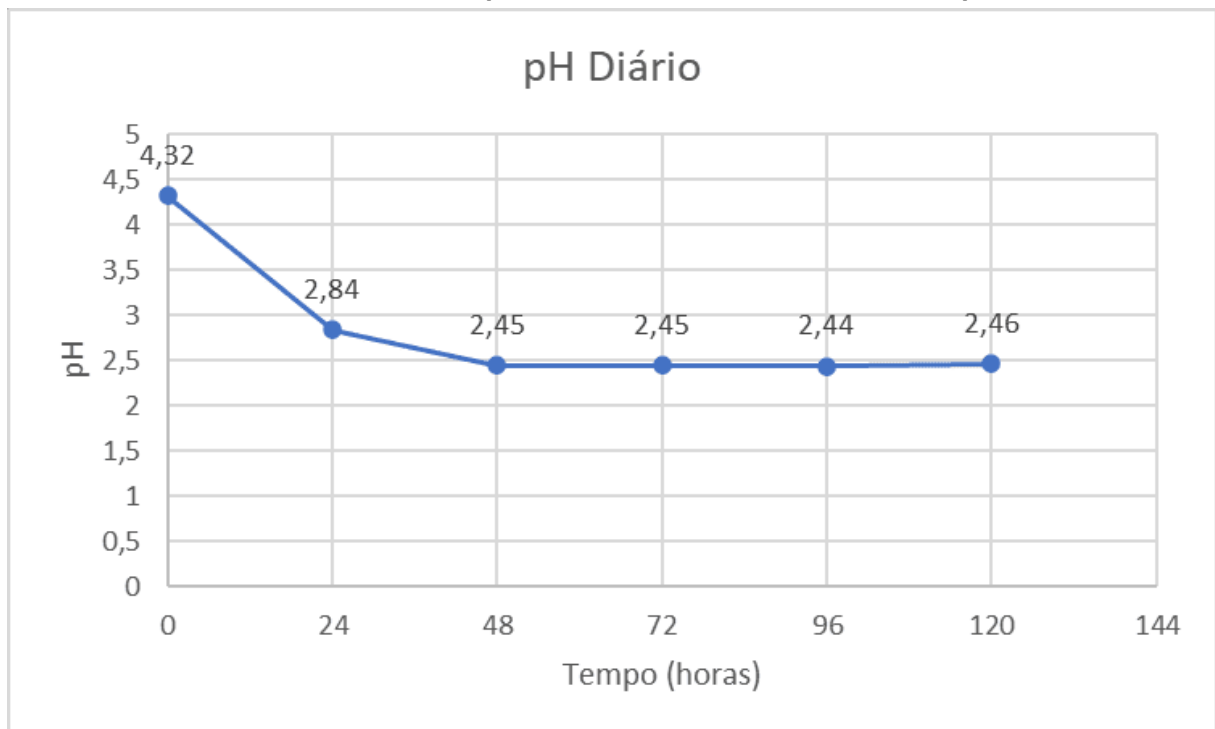
Fonte: Autoria Própria (2021)

O gráfico apresentado como gráfico 25 apresenta o gráfico de evolução diária de biomassa do fungo em função do tempo. É visivelmente uma curva logarítmica, então a função de tendência foi adaptada para uma curva logarítmica de equação $Biomassa = 2,0297 * \ln(t) - 4,098$, onde t é o tempo expresso em horas, e biomassa é a concentração de biomassa em g/L.

Esse gráfico por ser uma função logarítmica indica que a população microbiana está em tendência de atingir o seu máximo, devido às limitações do meio de cultivo, que tem uma concentração de nitrogênio bem baixa em relação a concentração de carbono, o que limita o crescimento do fungo, mas que também pode ter sido ocasionado por outros fatores, como pH baixo demais para a cepa, ou produção de compostos tóxicos para a cepa.

Esse comportamento logarítmico também pode dar indícios da causa da cepa não ter produzido pululana durante o experimento, o que indica que algo estava inibindo tanto a produção da pululana como o crescimento celular.

Gráfico 26 - Evolução pH diário da biomassa utilizando a cepa B

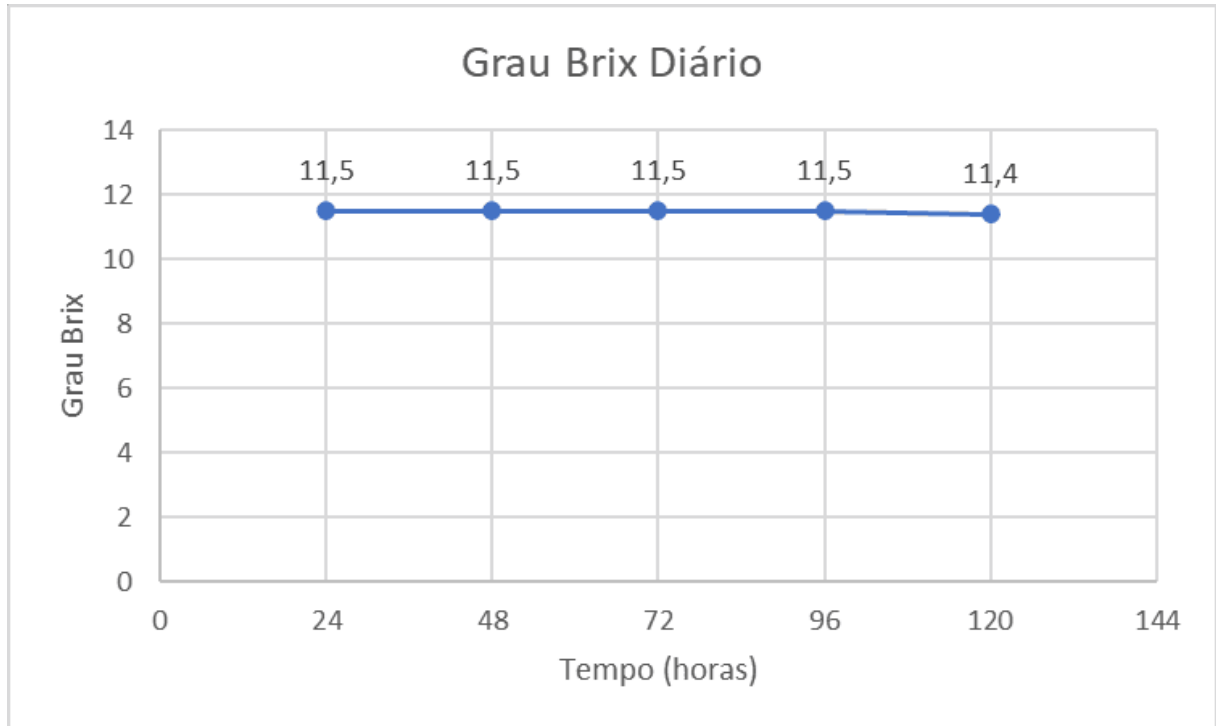


Fonte: Autoria Própria (2021)

A evolução diária do pH apresentado pela cepa B no gráfico 26, apresenta comportamento bem similar ao da cepa americana, onde o pH abaixa bastante em

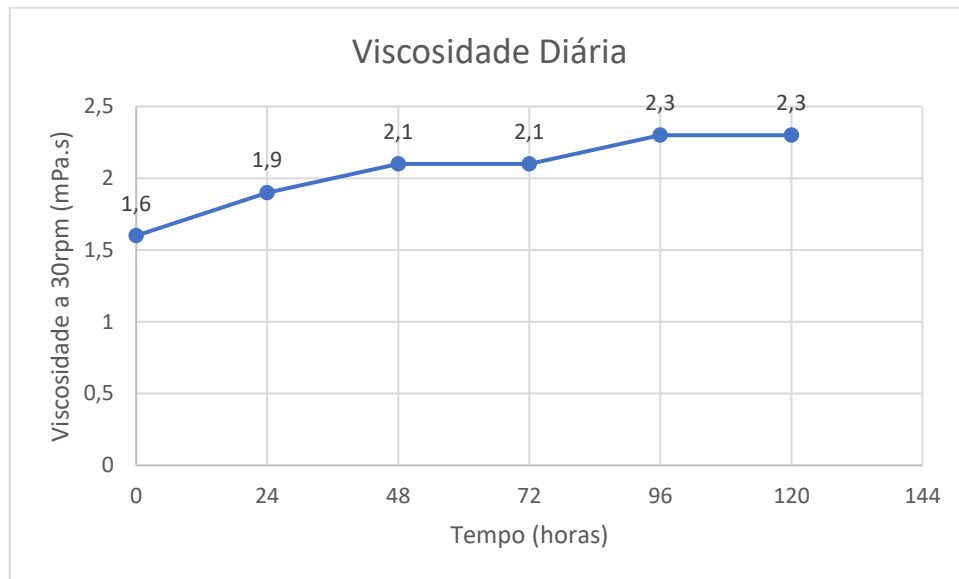
24h e após isso começa a apresentar um comportamento constante até o fim do experimento, podendo indicar a diminuição na produção de ácidos orgânicos pelo microrganismo.

Gráfico 27 - Evolução diária do grau Brix utilizando a cepa B



Fonte: Autoria Própria (2021)

O grau Brix, mostrado no gráfico 27 indicou também um comportamento similar ao da cepa CCT 4154, mas com uma variação ainda menor, o que pode indicar menor utilização da glicose, sólido solúvel em maior concentração no meio fermentado, e que também indica que parte desse carbono não foi utilizado para a produção do exopolissacarídeo.

Gráfico 28 - Evolução diária da viscosidade a 30 rpm utilizando a cepa B

Fonte: Autoria Própria (2021)

No gráfico 28 é apresentada a evolução da viscosidade, que não subiu muito como o da cepa CCT 4154, devido à falta de pululana no meio de cultivo, que garantiria maior viscosidade. O leve crescimento na viscosidade, imperceptível sem a utilização de equipamento de análise, pode ter sido ocasionado pela produção de outros compostos no meio, além da própria pululana, mas em uma quantidade muito pequena.

Não foi elaborado nenhum gráfico a respeito da pululana extraída pois não foi possível extrair pululana das amostras devido à baixa ou nenhuma concentração de pululana no meio fermentado.

6 CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível prever os melhores valores para as variáveis de estudo para a produção de pululana para a cepa CCT 4154, sendo pH inicial de 4,32, concentração de sacarose de 117 g/L e concentração de sulfato de amônio de 0,62 g/L. Esses valores ainda podem ser melhorados no caso do pH, podendo ser investigado em novos estudos para pH menor que 4,32, e no caso da sacarose para valores acima de 117 g/L, enquanto a concentração de sulfato de amônio para essa composição de cultivo é predita como a melhor concentração não necessitando de novos estudos. O estudo da produção de pululana com a cepa B não resultou em resultados com boa preditibilidade, havendo necessidade de serem refeitos em estudos futuros e avaliar os erros que podem ter causado esse resultado.

Os valores da cepa CCT 4154 são semelhantes aos dados obtidos da literatura com cepas diferentes, enquanto a cepa B apresenta valores bem diferentes, podendo ser explicadas pelo fato de serem cepas com parâmetros fermentativos e metabólicos diferentes.

A otimização com relação a biomassa das duas cepas pode ser utilizada em novos estudos devido ao seu nível de preditibilidade aceitável para experimentos biológicos. Com ambas as cepas utilizando o pH de 7,68, que ainda pode ser melhorado se estudado em níveis de pH maiores, a sacarose de 59,29 g/L para a cepa americana e 32,96 g/L para a cepa B, além do sulfato de amônio de 0,63 g/L para a cepa americana e de 0,26 g/L para a cepa B.

O estudo também avaliou a evolução diária do grau Brix, da concentração de biomassa e de pululana do caldo fermentado, o pH do caldo fermentado e viscosidade, que podem facilitar a determinação do tempo ideal de fermentação em um novo estudo, obtendo melhores valores de pululana numa fermentação de 96 horas.

A curva de viscosidade elaborada irá poupar tempo, energia e consumo de reagentes para determinação da concentração de pululana em trabalhos futuros, pois com análises utilizando um viscosímetro, será possível a determinação da concentração de pululana no meio fermentado a partir da equação obtida da curva, evitando o gasto de etanol, que é utilizado em um volume muito alto para extração da pululana, além do gasto de energia e tempo decorrentes da secagem do material extraído.

REFERÊNCIAS

- CAMPBELL, B. *et al.* Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production? **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 232, n. 2, p. 225-228, mar. 2004. Oxford University Press (OUP). Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(04\)00076-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(04)00076-x). Acesso em: 25 nov. 2021.
- FILHO, A. C. P. M.; SOUSA, W. C.; CASTRO, C. F. S. Características de embalagens biodegradáveis a partir do resíduo de melancia e incorporadas com amido do tubérculo de *Sinningia elatior*. **Research, Society And Development**, ago. 2020.
- LIU, F. *et al.* Correlation between the synthesis of pullulan and melanin in *Aureobasidium pullulans*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 177, p. 252-260, abr. 2021. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.108>. Acesso em: 2 ago. 2021.
- OLIVEIRA, J. D. **DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLÓGICO DE PULULANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- OLIVEIRA, J. D. **EFEITO DA FONTE E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Aureobasidium Pullulans***. 2010. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- OLIVEIRA, J. D. *et al.* Rheological Analysis of Biopolymer Produced by *Aureobasidium Pullulans* in Different Sources of Nitrogen. **Macromolecular Symposia**, [S.L.], v. 319, n. 1, p. 143-149, set. 2012. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/masy.201100171>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- SANTOS, J. E. **PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA PELO FUNGO *Aureobasidium pullulans* EM MELAÇO DE CANA**. 2020. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa.
- SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 73, n. 4, p. 515-531, set. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.003>. Acesso em: 2 ago. 2021.
- SUEIRO, A. C. *et al.* FILMES BIODEGRADÁVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA, PULULANA E CELULOSE BACTERIANA. **Química Nova**. 2016, v. 39, n. 09 pp. 1059-1064. ISSN 1678-7064. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160118>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- SUGUMARAN, K.R.; PONNUSAMI, V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 173, p. 573-591, out. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.022>. Acesso em: 3 ago. 2021.

SHENG, L.; ZHU, G.; TONG, Q. Comparative Proteomic Analysis of *Aureobasidium pullulans* in the Presence of High and Low Levels of Nitrogen Source. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 62, n. 43, p. 10529-10534, 15 out. 2014. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf503390f>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SHENG, L.; TONG, Q.; MA, M. Why sucrose is the most suitable substrate for pullulan fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234? **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 92, p. 49-55, out. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.016>. Acesso em: 8 ago. 2021.

SUZUKI, T. *et al.* Biological Activity of High-Purity β -1,3-1,6-Glucan Derived from the Black Yeast *Aureobasidium pullulans*: a literature review. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 242, 16 jan. 2021. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/nu13010242>. Acesso em: 18 out. 2021.

XIA, Z.; WU, S.; PAN, S. Effect of two-stage controlled pH and temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 86, n. 4, p. 1814-1816, out. 2011. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.087>. Acesso em: 13 ago. 2021.

WANG, D.; YU, X.; GONGYUAN, W. Pullulan production and physiological characteristics of *Aureobasidium pullulans* under acid stress. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 97, n. 18, p. 8069-8077, 20 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5094-4>. Acesso em: 5 ago. 2021.

WANG, D. *et al.* The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 127, p. 325-331, ago. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.079>. Acesso em: 18 ago. 2021.

WU, S. *et al.* Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 737-741, 8 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0231-z>. Acesso em: 5 ago. 2021.

YANG, J. *et al.* Statistical Optimization of Medium for Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* NCPS2016 Using Fructose and Soybean Meal Hydrolysates. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 1334, 1 jun. 2018. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23061334>. Acesso em: 18 ago. 2021.