

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

MARCELO LUIS KUHN MARCHIORO

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E pH INICIAL
SOBRE A PRODUÇÃO MICROBIANA DE LASIODIPLODANA EM
MEIO A BASE DE MELAÇO DE SOJA DE SOJA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2018**

MARCELO LUIS KUHN MARCHIORO

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E pH INICIAL
SOBRE A PRODUÇÃO MICROBIANA DE LASIODIPLODANA EM
MEIO A BASE DE MELAÇO DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Coorientadora: Vidianny Aparecida Queiroz Santos

PATO BRANCO

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Influência da Concentração do Substrato e Ph Inicial Sobre a Produção Microbiana de Lasiodiplodana em Meio a Base de Melaço de Soja foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 6.2.2018 de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Mário Antônio Alves da Cunha
Orientador

Márcio Barreto Rodrigues
Membro da Banca

Vanderlei Aparecido de Lima
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Arlei Luis Marchioro e Dulce Backes Kuhn Marchioro, pelo apoio emocional e carinho incondicional, durante o curso, que foram de fundamental importância para minha chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela saúde, família, amigos e principalmente pela força a mim concedida para chegar ao fim desta caminhada.

Ao meus pais, Arlei Luis Marchioro e Dulce Backes Kuhn Marchioro, e a minha irmã Gabriela Kuhn Marchioro, por todo amor e carinho. Obrigado por todo apoio nessa caminhada.

Aos meus amigos, Jefferson Cristiano Gemelli e Marcus André Cardoso de Araújo, que estão ao meu lado desde o início do curso, compartilhando das alegrias e frustrações. A Crisielen Rizzon Massaroli, amiga que fiz durante a caminhada, por sua amizade e apoio nos momentos em que precisei. Também agradeço a Gabrielle Cristina Calegari, parceira recorrente de laboratório, obrigado pela ajuda, conhecimento a mim transmitido e pela amizade, que foram de fundamental importância. A Doutora Edenes Maria Schroll Loss, pela orientação durante o meu período de estágio principalmente pela amizade.

E por fim agradeço ao meu Professor orientador Doutor Mário Antônio Alves da Cunha, pelos ensinamentos e auxílio ao meu trabalho. E também a minha coorientadora Doutora Vidianny Aparecida Queiroz Santos, por todo conhecimento e companheirismo no laboratório, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação.

E a todos os meus colegas e professores que de alguma forma contribuíram nesses anos, muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Só podemos atingir a excelência em algo se estivermos dispostos a falhar. Se você se recusa a correr o risco, não está disposto a ser bem-sucedido”.

Mark Manson

RESUMO

MARCHIORO, Marcelo Luis Kuhn. Influência da concentração do substrato e pH inicial sobre a produção microbiana de lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja. 2018. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

β -Glucanas são polissacarídeos constituintes da parede celular de alguns fungos, leveduras e cereais. Comercialmente, a maioria das β -glucanas têm sido extraídas da parede celular de leveduras e cereais, porém, algumas podem ser produzidas e secretadas para o meio extracelular por microrganismos cultivados em sistemas submersos. Entre as β -Glucanas extracelulares destaca-se a lasiodiplodana, que é uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. O fungo *L. theobromae* tem sido bastante eficiente na produção de lasiodiplodana em meios de cultivo a base de glicose, maltose e sacarose, entretanto, o uso de fontes de carbono alternativas poderia reduzir o custo de produção. Neste sentido, o melaço de soja, um coproduto do processo de produção de concentrado proteico de soja, tem demonstrado potencial como substrato para a produção de bioprodutos, em função da elevada concentração de açúcares. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a utilização do melaço de soja como substrato para a produção da lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Delineamento fatorial completo (2)² foi empregado para avaliar o efeito da concentração do substrato e do pH inicial sobre a produção e rendimento de lasiodiplodana e crescimento micelial. Estudo cinético foi conduzido para determinação do tempo de cultivo, em cultivos empregando as condições otimizadas de concentração de substrato e pH inicial. A variável concentração de substrato teve efeito negativo sobre a produção (P_F), rendimento em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) e rendimento em biomassa celular ($Y_{P/X}$), e efeito linear positivo sobre a produção de biomassa celular (P_X) ao nível de 95% de confiança. Os valores de pH estudados não demonstraram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre os parâmetros fermentativos. Maiores valores de produção (1,653 g/L) e rendimento (0,115 g/g) em lasiodiplodana e maior rendimento em biomassa celular (0,573 g/g) foram obtidos quando usando concentração inicial de 20 g/L (pH 4) de substrato. Maiores concentrações de substrato (60 g/L e pH 4) promoveram maior crescimento celular

(13,627 g/L). No estudo cinético foi verificada máxima produção de lasiodiplodana (0,89 g/L) e biomassa (7,33 g/L) após 96 horas de cultivo, sendo consumidos mais de 80% do substrato. O melaço de soja demonstrou ser um substrato alternativo, eficiente e de baixo custo para a produção de lasiodiplodana e biomassa celular a partir do cultivo submerso do fungo *L. theobromae* MMPI.

Palavras-chave: β -glucanas. fermentação submersa. subproduto da soja. Metabólitos.

ABSTRACTS

MARCHIORO, Marcelo Luis Kuhn. Influence of substrate concentration and initial pH on microbial production of lasiodiplodana in medium based on soybean molasses. 2018. 42 f. Completion of Course Work (B.A in Chemistry), Federal University of Technological Paraná. Pato Branco, 2018.

β -Glucans are polysaccharides that constitute the cell wall of some fungi, yeast and cereals. Commercially, most β -glucans have been extracted from the yeast and cereal cell wall, however, some can be produced and secreted into the extracellular medium by microorganisms cultured in submerged systems. Among the extracellular β -Glucans stands out the lasiodiplodan, which is a (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. This fungus has been cited as an efficient lasiodiplodan producer using culture media containing glucose, maltose and sucrose. However, the use of alternative carbon sources could reduce the cost of production. In this sense, soybean molasses, a co-product of the soy protein concentrate production process, has demonstrated potential as substrate for the different bioproducts production due to the high sugar's concentrations. This work aimed the use of soybean molasses as an alternative substrate for lasiodiplodan production by *L. theobromae* MMPI fungus. Experiments based on full factorial Design (2^2) were used to evaluate the effect of substrate concentration and initial pH on the lasiodiplodan production and yield and mycelial growth. Kinetic study was conducted to determine the process time by using of the optimized conditions for substrate concentration and initial pH. The substrate concentration variable had a linear negative effect on lasiodiplodan yield ($Y_{P/S}$), and positive linear effect on the cellular biomass production (P_X) at 95% confidence level. The pH values studied did not show a significant effect ($p < 0.05$) on the fermentation parameters. Higher values of lasiodiplodan production (1.653 g/L) and yield (0.115 g/g) and higher yield in cell biomass (0.573 g / g) were obtained when using substrate concentration of 20 g/L and initial pH adjusted on 4. Higher substrate concentrations (60 g/L and pH 4) promoted higher cell growth (13.627 g/L). In the kinetic study, the maximum lasiodiplodan production (0.89 g/L) and biomass (7.33 g/L) were observed after 96 hours of cultivation, consuming more than 80% of the

substrate. Soybean molasses proved to be an efficient, low cost and alternative substrate for lasiodiplodan and cell biomass production from the submerged culture of the *L. theobromae* MMPI fungus.

Key words: β -glucans. submerged fermentation. by-product of soybeans. Metabolites.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de soja e do melaço de soja. | 19 |
| Figura 2 - Estrutura molecular dos principais açúcares da soja. | 20 |
| Figura 3 - a) melaço de soja bruto; b) placa de Petri contendo micélio aéreo do fungo <i>L. theobromae</i> . Fonte: Autoria própria..... | 23 |
| Figura 4 - Cultivo submerso do fungo <i>L. theobromae</i> MMPI em meio a base de melaço de soja..... | 25 |
| Figura 5 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção de lasiodiplodana. | 30 |
| Figura 6 - Superfície de resposta para a produção de lasiodiplodana. | 31 |
| Figura 7 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados sobre o rendimento em lasiodiplodana. | 32 |
| Figura 8 - Superfície de resposta para o rendimento em lasiodiplodana. | 33 |
| Figura 9 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção de biomassa celular..... | 35 |
| Figura 10 - Superfície de resposta para a produção de biomassa celular. | 36 |
| Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o rendimento em biomassa..... | 37 |
| Figura 12 - Superfície de resposta para o rendimento em biomassa celular..... | 38 |
| Figura 13 - Perfil fermentativo da produção de lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja. | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Planejamento experimental (Delineamento Fatorial Completo 2 ²) | 26 |
| Tabela 2 - Resultados de produção, rendimento e produtividade volumétrica de lasiodiplodana após 96 horas de cultivo seguindo delineamento experimental. | 29 |
| Tabela 3 - Efeitos principais estimados para produção de lasiodiplodana | 29 |
| Tabela 4 - Efeitos principais estimados sobre o rendimento em lasiodiplodana. | 32 |
| Tabela 5 - Resultados de produção, rendimento e produtividade volumétrica em biomassa celular. | 34 |
| Tabela 6 - Efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular. | 35 |
| Tabela 7 - Efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular. | 37 |
| Tabela 8 - Parâmetros fermentativos observados no cultivo do <i>L. theobromae</i> MMPI. | 39 |

LISTA DE ACRÔNIMOS

ATR - Açúcares totais residuais;
°C – Graus célsius;
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência;
CS - Consumo de substrato;
DMS - Diferença mínima significativa;
DNA - Ácido desoxirribonucleico;
EPS – Exopolissacarídeo;
g/g - Grama produto formado por grama de substrato consumido;
g/L – Gramas por litro;
g/L.h – Grama por litro de produto formado por hora;
h – Horas;
L – Efeito linear;
L.C (-) – Limite de confiança inferior;
L.C (+) – Limite de confiança superior;
L. theobromae – Lasiodiplodia theobromae MMPI;
µm – Micrômetro;
ml – Mililitro;
m/v – Razão entre massa e volume;
min – Minuto;
MMV – Meio mínimo de Vogel;
mol/L – Mol por litro;
nm– Nanômetros;
 p – p valor;
 P_F - Produção de lasiodiplodana;
 P_X - Produção de biomassa;
Q – Efeito quadrático;
 Q_P - Produtividade volumétrica em lasiodiplodana;
 Q_S - Taxa global de substrato consumido;
 Q_X - Produtividade volumétrica em biomassa celular;
rpm – Rotações por minuto;
S – Substrato;
 t_{cal} – t calculado;

t_{tab} – t tabelado;

$Y_{P/S}$ - Conversão de substrato em lasiodiplodana;

Y_c - percentual de consumo de substrato;

Y_e - Rendimento específico;

$Y_{X/S}$ - Conversão de substrato em biomassa.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 GERAL | 17 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 3.1 SOJA..... | 18 |
| 3.2 MELAÇO DE SOJA | 18 |
| 3.3 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS | 21 |
| 3.4 B-GLUCANAS | 21 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 MICRORGANISMO E MATERIA-PRIMA | 23 |
| 4.2 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA | 23 |
| 4.2.1 Clarificação do melaço | 23 |
| 4.2.2 Caracterização do melaço..... | 24 |
| 4.3 PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA..... | 24 |
| 4.3.1 Preparo do Inóculo | 24 |
| 4.3.2 Fermentação Submersa Para Avaliação da Influência da Concentração do Substrato e pH Inicial do Meio de Cultivo na Produção de Lasiodiplodana e Crescimento Micelial | 24 |
| 4.3.3 Métodos Analíticos | 26 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 29 |
| 5.1 INFLUÊNCIA DO PH INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO E RENDIMENTO DE LASIODIPLODANA | 29 |
| 5.1.1 Avaliação da Produção da Lasiodiplodana..... | 29 |
| 5.1.2 Avaliação do Rendimento em lasiodiplodana..... | 32 |
| 5.2 INFLUÊNCIA DO PH INICIAL E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO E RENDIMENTO EM BIOMASSA CELULAR | 34 |
| 5.2.1 Avaliação da Produção de Biomassa Celular..... | 34 |
| 5.2.2 Avaliação do rendimento em Biomassa | 37 |
| 5.3 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA E BIOMASSA CELULAR..... | 38 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 6 CONCLUSÕES | 42 |
| REFERÊNCIAS..... | 43 |

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos microbianos têm despertado interesse comercial devido às suas propriedades tecnológicas e bioatividade. Dentre estes biopolímeros, destacam-se as β -glucanas, que são constituintes da parede celular de bactérias, fungos, leveduras e cereais e têm demonstrado diversas potencialidades biológicas, como por exemplo, capacidade antioxidante, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e imunoestimuladora.

As β -glucanas oriundas de microrganismos apresentam diferentes estruturas químicas, incluindo ligações glicosídicas com configuração alfa ou beta e estrutura linear ou ramificada. A lasiodiplodana, uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana, tem sido produzida, em cultivo submerso, pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em meio contendo glicose ou sacarose como fontes de carbono. Em estudos recentes foi verificado que a lasiodiplodana possui capacidade antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7 (CUNHA et al., 2012), atividade hipocolesterolêmica (TÚRMINA et al., 2012) e potencial antioxidante (KAGIMURA et al., 2015).

O fungo *L. theobromae* MMPI tem demonstrado bastante eficiência na produção da lasiodiplodana em meios a base de glicose ou maltose, entretanto, o uso de fontes de carbono alternativas poderia contribuir para a redução dos custos agregados ao processo de bioprodução da lasiodiplodana. Neste contexto, o melão de soja, um coproduto gerado durante o processamento da soja para obtenção do concentrado proteico de soja, tem demonstrado potencial para utilização como substrato para a biossíntese de compostos de interesse industrial e tecnológico, devido à alta concentração de açúcares e ao baixo custo econômico.

A utilização de resíduos, subprodutos e coprodutos agroindustriais de baixo valor econômico para a obtenção de compostos bioativos como as β -glucanas, além de agregar valor às cadeias produtivas, também é uma alternativa ecológica, pois o acúmulo de resíduos no ambiente pode resultar em desequilíbrio ambiental e aumento da poluição.

Neste sentido, o presente trabalho propõe o cultivo submerso do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, utilizando melão de soja como substrato para a produção da lasiodiplodana. Foi estudada a influência dos parâmetros concentração de substrato (melão de soja) e pH inicial do meio de cultivo sobre a produção da lasiodiplodana e crescimento micelial.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer as melhores condições de processo (concentração de substrato e pH inicial) para a bioprodução de lasiodiplodana (1→6-β-D-glucana) em meio a base de melaço de soja, utilizando cultivo submerso em sistema descontínuo.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito de diferentes concentrações do melaço de soja (20, 40, 60 g/L de açúcares totais) e diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo (4, 6 e 8) na produção de lasiodiplodana, utilizando planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional).
2. Avaliar o consumo do substrato (teores de açúcares totais) nos ensaios de produção de lasiodiplodana.
3. Avaliar a produção de lasiodiplodana e o crescimento micelial nos ensaios fermentativos.
4. Realizar estudo cinético da produção de lasiodiplodana, estudando os parâmetros fermentativos: produção de lasiodiplodana e biomassa micelial, rendimentos em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) e biomassa micelial ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica em lasiodiplodana (Q_P) e biomassa micelial (Q_X), rendimento específico ($Y_{P/X}$), percentual de consumo de substrato (Y_c) e consumo global de substrato (Q_S) em fermentações conduzidas nas condições pré-otimizadas de concentração de substrato e pH inicial do meio de cultivo, para determinar o melhor tempo de cultivo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SOJA

A soja é uma planta leguminosa de origem asiática, domesticada há cerca de 4500 anos para utilização na dieta humana (LOPES, 2010). A cultura foi difundida no mundo principalmente por imigrantes chineses e japoneses e por viajantes ingleses sendo considerada uma das culturas mais antigas (MISSÃO, 2006).

Esta leguminosa foi mencionada pela primeira vez nos EUA no ano de 1804, no estado da Pensilvânia, como uma planta forrageira e promissora produtora de grãos, mas teve seu potencial reconhecido somente a partir de 1880. Sua expansão como cultura se deu a partir de 1930, e em poucas décadas se tornou um dos maiores fenômenos da agricultura norte-americana (CÂMARA, 2015).

Os primeiros relatos sobre o cultivo da soja no Brasil ocorreram em 1882, no estado da Bahia e em seguida, foi introduzida no estado de São Paulo por imigrantes japoneses (FREITAS, 2011). No Rio Grande do Sul foi introduzida oficialmente em 1914. No entanto, a grande expansão no cultivo da soja no Brasil se deu apenas nos anos 70 (NUTRACÊUTICOS, 2007). Desde então, a soja é a cultura agrícola de maior destaque no Brasil, tendo na safra 2016/2017 uma produção de 114.075,3 milhões de toneladas em 33.909,4 mil hectares de área plantada (CONAB, 2018).

Em relação a composição nutricional, o grão da soja apresenta uma composição média de 40,3% de proteínas, 33,9% de carboidratos, 21,0% de óleos e 4,9% de resíduo mineral em base seca. A composição química da soja, aliada à sua rusticidade e produtividade, fazem da soja a cultura vegetal com maior produção de proteína no mundo. O maior emprego da soja é na indústria de esmagamento, para a produção de óleo de soja e farelo de soja (PÍPOLO et al., 2015). Além destes, a partir do grão de soja, também são produzidos o concentrado proteico de soja (carne de soja) e o extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja) que tem grande importância econômica e comercial, especialmente entre o público vegetariano. Durante o processo de obtenção destes derivados da soja são produzidos subprodutos ricos em matéria orgânica, dentre os quais destaca-se o melão de soja.

3.2 MELAÇO DE SOJA

O melaço da soja é um coproduto gerado no processo de produção de concentrado proteico de soja, onde os açúcares são extraídos utilizando-se uma mistura de água e etanol como solvente (SIQUEIRA et al., 2008). O processo consiste na lavagem do farelo de soja desengordurado com o solvente, onde os carboidratos e outros compostos solúveis são extraídos, restando a proteína concentrada. A água e o etanol são evaporados e é obtido então o melaço de soja (CALDEIRÃO et al., 2016). O fluxograma do processo pode ser observado na Figura 1.

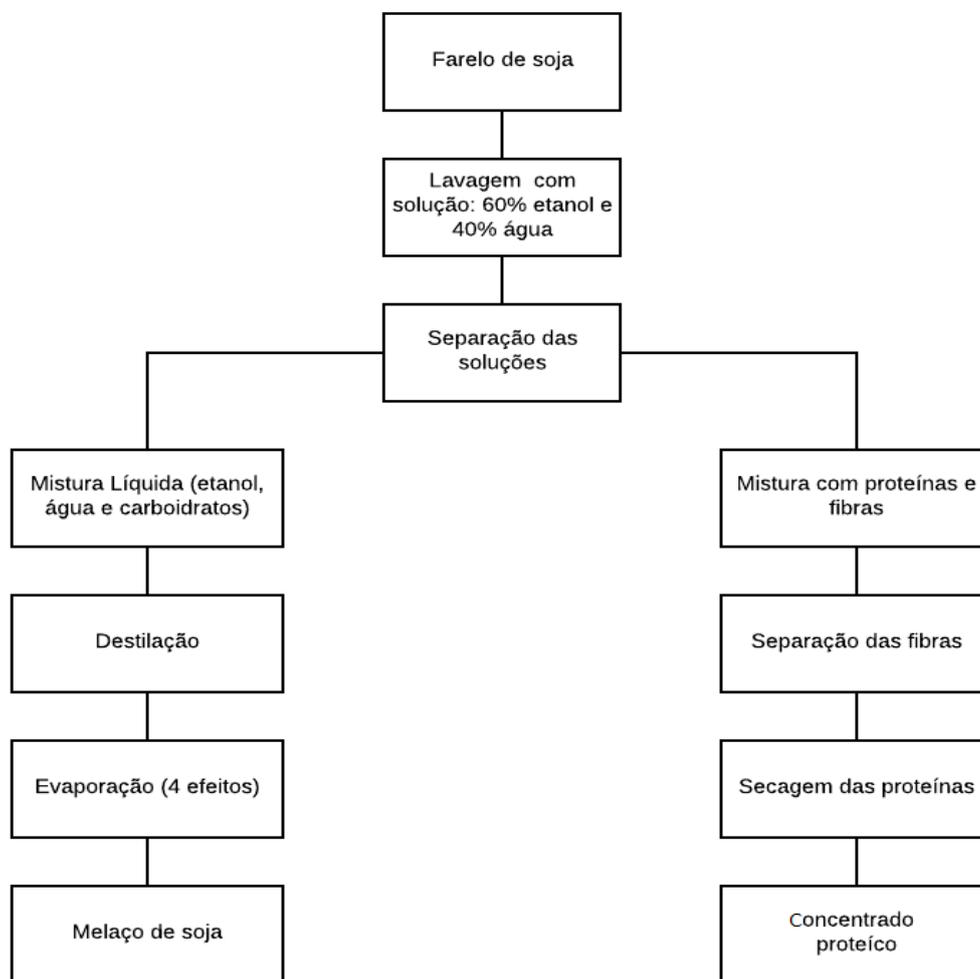


Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de soja e do melaço de soja. **Fonte:** Adaptado de Schneider (2016).

O melaço de soja é constituído em grande parte por carboidratos, além de gorduras, flavonoides, proteínas e minerais. Entre os carboidratos destacam-se a frutose, glicose, sacarose, estaquiase, rafinose, e verbascose (QURESHI; LOLAS; BLASCHEK, 2001).

Dentre os açúcares solúveis presentes no melaço de soja, o mais representativo é a sacarose, seguida dos oligossacarídeos estaquiiose e rafinose (OLIVEIRA et al., 2010). A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose ligada a uma molécula de frutose por meio de uma ligação α -glicosídica (MARGGRAF, 2012). Já a estaquiiose é um tetrassacarídeo formado por uma molécula de frutose, uma de glicose e duas moléculas de galactose, enquanto a rafinose é um trissacarídeo constituído por uma galactose, uma frutose e uma glicose (FERNANDES; PROENÇA, 2011). Na Figura 2 estão representadas as estruturas químicas destes açúcares.

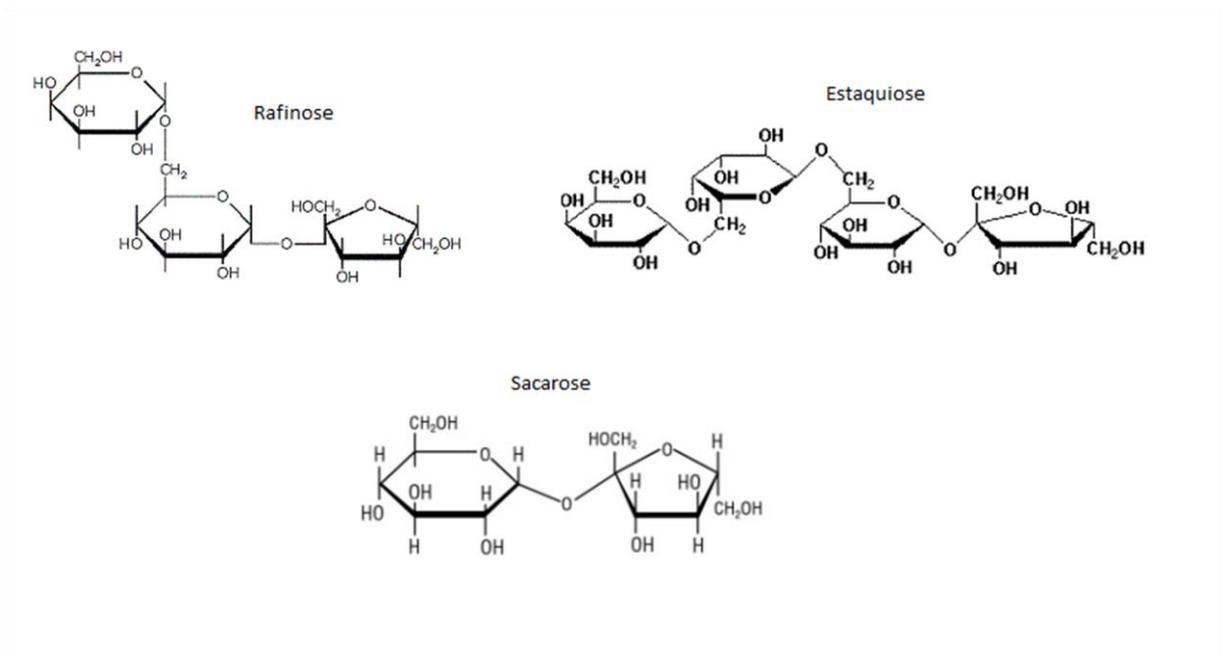


Figura 2 - Estrutura molecular dos principais açúcares da soja.

Fonte: Autoria própria.

A maior parte do melaço de soja produzido no Brasil é destinado a alimentação animal (SIQUEIRA et al., 2008) e algumas indústrias processadoras de soja, já vem utilizando o melaço de soja para produção de etanol. Entretanto, o uso restringe-se apenas como fonte de energia combustível para a própria indústria (CALDEIRÃO et al., 2016). Além disso, devido à alta carga nutricional que o melaço de soja apresenta, seu descarte no meio ambiente geraria sérios problemas ambientais para ecossistemas aquáticos e terrestres.

3.3 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Os exopolissacarídeos microbianos são polímeros secretados por alguns fungos e bactérias e são constituídos principalmente de polímeros de carboidratos. Nas células microbianas, os exopolissacarídeos (EPSs) desempenham funções importantes como proteção contra a dessecação, estresse osmótico e compostos tóxicos, além de auxiliar na adesão da célula a superfícies sólidas para a formação de biofilmes (PATIL; SHIRSATH, 2015).

O desenvolvimento dos estudos sobre exopolissacarídeos microbianos se deu a partir da dextrana, produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, descrita no ano de 1884. Mais recentemente, têm sido descritos trabalhos sobre a produção de EPSs por de fungos filamentosos (BARBOSA et al., 2004).

Os exopolissacarídeos microbianos são comumente divididos em dois grupos, considerando sua constituição monomérica: os homopolissacarídeos, os quais são constituídos por apenas um tipo de monossacarídeo e os heteropolissacarídeos, constituídos por 3 a 7 unidades monossacarídicas diferentes. A possibilidade de diferentes ligações e arranjos entre os monômeros constituintes, possibilita a existência de uma grande variedade de polissacarídeos com características físico-químicas únicas (MEYBODI; MOHAMMADIFAR, 2015).

Estes biopolímeros, por serem capazes de formar géis e soluções viscosas, tem grande aplicação na indústria de alimentos como potencializadores de características reológicas, podendo ser aplicados como agentes de suspensão, gelificantes, substitutos de gordura, espessantes e emulsificantes (BORGES, 2004).

A goma xantana, um heteropolissacarídeo secretado pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é um dos principais exopolissacarídeos utilizados na indústria, principalmente na área alimentícia. Devido a sua estabilidade tanto em meios alcalinos quanto ácidos e na presença de sais, é usada principalmente como espessante, estabilizante e emulsificante para diversos molhos (MEYBODI; MOHAMMADIFAR, 2015).

3.4 β -GLUCANAS

As β -glucanas são polissacarídeos que constituem a parede celular de fungos, leveduras e alguns cereais (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Elas possuem

função estrutural na célula, auxiliando na manutenção da rigidez e integridade da parede celular dos fungos e das leveduras (BAUERMEISTER et al., 2010).

β -D-glucanas de origem fúngica podem ser isoladas da parede celular de leveduras e fungos filamentosos, corpos de frutificação de basidiomicetos e também podem ser secretadas extracelularmente por cultivos submersos em meios ricos em açúcares e minerais (SOMENSI, 2014). Estas macromoléculas tem se destacado devido à suas propriedades bioativas (THEIS et al, 2017).

A lasiodiplodana, uma β -D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, é constituída por resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas tipo β na posição (1 \rightarrow 6) e em solução, apresenta uma estrutura em triplice hélice (VASCONCELOS et al., 2008). Estudos mostram que a lasiodiplodana possui atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7 (CUNHA et al., 2012), atividade anticoagulante quando sulfonada (VASCONCELOS et al., 2013), e tem a atividade antioxidante potencializada quando carboximetilada (KAGIMURA et al., 2015). Também são reportados na literatura científica efeito hipoglicemiante, atividade transaminase (TÚRMINA et al., 2012), e efeito protetor contra a danos ao DNA induzidos pela droga antitumoral doxorubicina (Mello et al., 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E MATERIA-PRIMA

O melaço de soja que foi empregado no preparo dos meios de cultivo foi gentilmente fornecido pela empresa Selecta localizada em Araguari - MG.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) foi armazenado em Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 5 °C. Repiques mensais foram realizados para a manutenção da viabilidade da cepa.

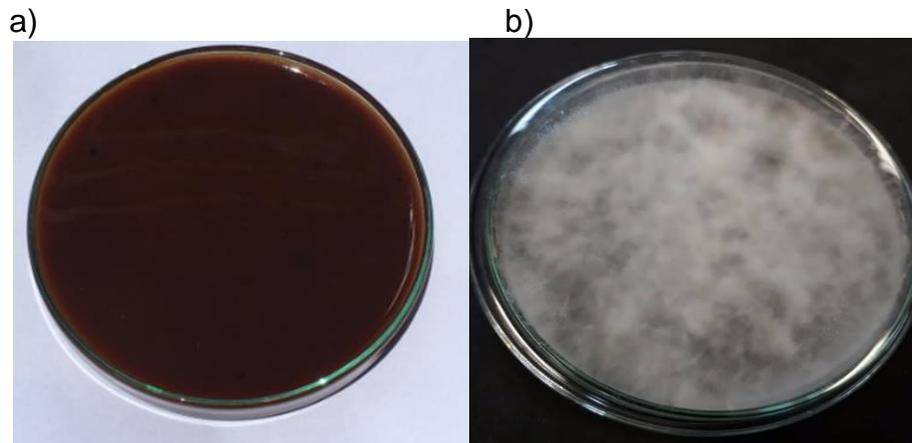


Figura 3 - a) melaço de soja bruto; b) placa de Petri contendo micélio aéreo do fungo *L. theobromae*.
Fonte: Autoria própria.

4.2 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 Clarificação do melaço

A clarificação foi realizada com o intuito de melhorar a fermentabilidade do melaço de soja. Inicialmente, o pH do melaço bruto foi ajustado para 3,0 com adição de ácido sulfúrico concentrado e submetido à agitação constante por 24 horas a 4 °C. Em seguida, o melaço foi centrifugado a 1500 g por 30 min e o pH do sobrenadante obtido foi ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 6 mol/L, sendo novamente centrifugado. O sobrenadante resultante (melaço clarificado) foi utilizado para os ensaios de produção da lasiodiplodana.

4.2.2 Caracterização do melaço

Os teores de glicose, frutose, sacarose, estaquiose e rafinose foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O melaço foi adequadamente diluído e filtrado em filtros com diâmetro de poro de 0,45 µm e em cartucho Sep-Pack C₁₈ para remoção de contaminantes como os compostos fenólicos. Os açúcares foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos de cada açúcar.

4.3 PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.3.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol foram inoculadas com uma alçada de micélio fúngico e incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas. Em seguida, o micélio fúngico crescido foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel - MMV (VOGEL, 1954) e glicose (5 g/L). Estes frascos foram incubados em agitador orbital (*shaker*) por 48 horas a 28 °C e 150 rpm.

Após a incubação, o micélio crescido foi separado do caldo fermentado por centrifugação (1500 x g, 20 min), diluído em solução salina 0,9 % (m/v) e triturado em liquidificador para obtenção de uma suspensão micelial com concentração padronizada por leitura espectrofotométrica em 400 nm (absorbância entre 0,4 e 0,5), conforme descrito por STELUTI (2004).

4.3.2 Fermentação Submersa Para Avaliação da Influência da Concentração do Substrato e pH Inicial do Meio de Cultivo na Produção de Lasiodiplodana e Crescimento Micelial

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de MMV, 10 mL do inóculo previamente padronizado e o melaço de soja clarificado nas diferentes concentrações de açúcares totais estudadas (20 g/L, 40 g/L e 60 g/L). O pH inicial do meio fermentativo foi ajustado antes da adição do inóculo, para valores de 4, 6 e 8, conforme delineamento experimental Fatorial Completo 2² (Tabela 1). Os

frascos foram incubados em incubadora orbital (*shaker*) a 28 °C, 150 rpm por 96 horas. No final dos cultivos foi quantificado o crescimento celular, a produção do exopolissacarídeo e o consumo do substrato. Após definição das melhores condições de cultivo foi conduzido estudo cinético da produção da lasiodiplodana em meio de cultivo a base de melaço de soja, empregando a melhor concentração de substrato e pH de cultivo (pré-definido experimentalmente). As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer empregando condições operacionais de cultivo similares a descrita acima. Amostras foram tomadas a cada 24 horas para a determinação dos parâmetros fermentativos: rendimento ($Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$), produtividade volumétrica (Q_P e Q_X), rendimento específico ($Y_{P/X}$), percentual de consumo de substrato (Y_C) e consumo global de substrato (Q_S) no final do processo.



Figura 4 - Cultivo submerso do fungo *L. theobromae* MMPI em meio a base de melaço de soja.
Fonte: Autoria própria

Tabela 1 - Planejamento experimental (Delineamento Fatorial Completo 2²)

| Experimentos | Variáveis independentes (valores codificados) | | |
|--------------|---|----------------|--|
| | X ₁ | X ₂ | |
| 1 | - 1 | - 1 | |
| 2 | - 1 | + 1 | |
| 3 | + 1 | + 1 | |
| 4 | + 1 | - 1 | |
| 5 | 0 (C) | 0 (C) | |
| 6 | 0 (C) | 0 (C) | |
| 7 | 0 (C) | 0 (C) | |
| 8 | 0 (C) | 0 (C) | |

| Variáveis | | Níveis (valores reais) | | |
|------------------------------|-------------------|------------------------|------|------|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Concentração substrato (g/L) | (X ₁) | 20,0 | 40,0 | 60,0 |
| pH inicial | (X ₂) | 4,0 | 6,0 | 8,0 |

4.3.3 Métodos Analíticos

4.3.3.1 Determinação da produção de lasiodiplodana e teor de biomassa fúngica

O caldo fermentado foi separado da biomassa por centrifugação a 1500 x g/ 20 min. Em seguida, a biomassa fúngica foi lavada com água destilada a 60 °C até completa remoção da lasiodiplodana aderida ao micélio e então foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante.

A lasiodiplodana foi separada do caldo fermentativo por precipitação em três volumes de etanol (95%) a 5 °C, *overnight*. A lasiodiplodana precipitada foi seca em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante.

4.3.3.2 Determinação dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos determinados no estudo cinético da produção da lasiodiplodana nas condições pré-otimizadas foram determinados conforme equações abaixo:

1) *Fator de conversão (rendimento) do substrato em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$):*

Determinado pela relação entre a quantidade de lasiodiplodana produzida e a correspondente variação do substrato (S).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{lasiodiplodana (g/L)}}{\text{consumo de substrato (g/L)}}$$

2) *Fator de conversão (rendimento) do substrato em Biomassa ($Y_{X/S}$)*

Determinado pela relação entre a quantidade de biomassa produzida (X) e a correspondente variação do substrato (S).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{biomassa celular (g/L)}}{\text{consumo de substrato (g/L)}}$$

3) *Produtividade volumétrica em lasiodiplodana (Q_P)*

Foi determinada pela razão entre a quantidade de lasiodiplodana produzida e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_P = \frac{\text{lasiodiplodana (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}}$$

4) *Produtividade volumétrica em biomassa (Q_X)*

Foi determinada pela razão entre a quantidade de biomassa produzida e o intervalo de tempo correspondente.

$$Q_X = \frac{\text{biomassa celular (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}}$$

6) *Percentual de consumo de substrato (Y_C)*

O percentual de consumo de substrato foi determinado pela relação entre o conteúdo de substrato consumido ao longo da fermentação e o conteúdo inicial do mesmo.

$$Y_C = \frac{\text{consumo de substrato (g/L)}}{\text{substrato inicial (g/L)}} * 100$$

7) *Taxa total de consumo de substrato (Q_S)*

Foi calculado a partir da razão do consumo de substrato pelo tempo.

$$Q_s = \frac{\text{consumo de substrato (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}}$$

8) *Rendimento específico (Y_e)*

Calculado a partir da razão entre a produção de lasiodiplodana pela produção de biomassa celular.

$$Y_e = \frac{\text{lasiodiplodana (g/L)}}{\text{biomassa celular (g/L)}}$$

4.3.3.3 Determinação do consumo do substrato

Açúcares residuais totais foram determinados pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, 1956) no meio fermentativo após remoção da lasiodiplodana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 INFLUÊNCIA DO pH INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO E RENDIMENTO DE LASIODIPLODANA

5.1.1 Avaliação da Produção da Lasiodiplodana

Nas Tabela 2 e Tabela 3, estão apresentados os resultados referentes ao delineamento experimental e estimativa dos efeitos das variáveis sobre a produção da lasiodiplodana, respectivamente.

Tabela 2 - Resultados de produção, rendimento e produtividade volumétrica de lasiodiplodana após 96 horas de cultivo seguindo delineamento experimental.

| Experimentos | Valores codificados (reais) | | Resultado após 96 h de cultivo | | |
|--------------|---|---------|--|--|---|
| | Concentração de substrato (g.L ⁻¹) | pH | P _F (g.L ⁻¹) | Y _{P/S} (g.g ⁻¹) | Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
| 1 | - 1 (20) | - 1 (4) | 1,653 | 0,115 | 0,017 |
| 2 | - 1 (20) | + 1 (8) | 1,427 | 0,082 | 0,015 |
| 3 | + 1 (60) | + 1 (8) | 0,600 | 0,012 | 0,006 |
| 4 | + 1 (60) | - 1 (4) | 0,720 | 0,016 | 0,007 |
| 5 | 0 (40) | 0 (6) | 0,760 | 0,022 | 0,008 |
| 6 | 0 (40) | 0 (6) | 0,600 | 0,017 | 0,006 |
| 7 | 0 (40) | 0 (6) | 1,000 | 0,029 | 0,010 |
| 8 | 0 (40) | 0 (6) | 1,080 | 0,033 | 0,011 |

Tabela 3 - Efeitos principais estimados para produção de lasiodiplodana

| Variáveis | Efeito | t calculado | p | L.C. (-95%) | L.C. (+95%) |
|----------------|-----------|-------------|----------|-------------|-------------|
| Média | 0,980000 | 10,85544 | 0,000409 | 0,72935 | 1,230650 |
| Substrato | -0,880000 | -3,44635 | 0,026142 | -1,58895 | -0,171054 |
| pH | -0,173333 | -0,67883 | 0,534494 | -0,88228 | 0,535612 |
| Substrato x pH | 0,053333 | 0,20887 | 0,844756 | -0,65561 | 0,762279 |

t tab: 2,776445; L.C: Limite de confiança.

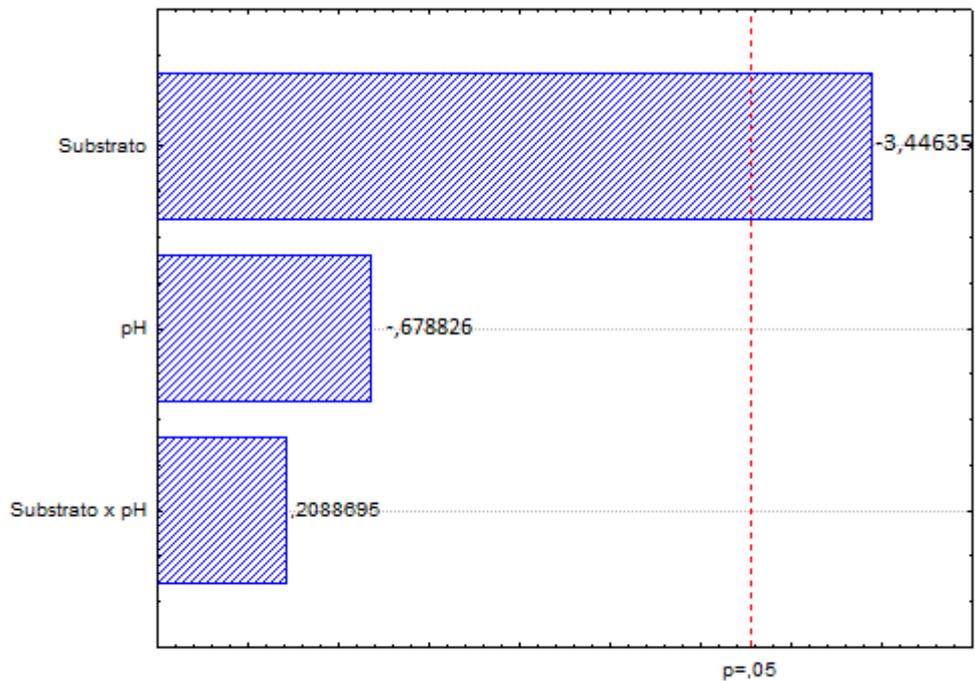


Figura 5 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção de lasiodiplodana.
Fonte: Autoria Própria.

Conforme pode ser verificado na Tabela 3 e no gráfico de Pareto (Figura 5), houve influência significativa apenas da variável concentração de substrato sobre a produção de lasiodiplodana (P_F), ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Os valores de t calculado (Tabela 3) foram superiores ao de t tabelado, assim como valores de p foram inferiores a 0,05 para esta variável, demonstrando que houve efeito significativo do variável substrato. Para o pH não houve efeito significativo, e nem efeito de interação entre as variáveis, em relação a resposta produção de lasiodiplodana.

Uma superfície de resposta (Figura 6) foi construída e suas informações avaliadas como tendência. Neste sentido, é possível verificar tendência de maior produção de lasiodiplodana quando concentrações mais baixas de substrato são empregadas. Com relação ao pH inicial de cultivo, observa-se tendência de maior produção de lasiodiplodana em uma faixa relativamente ampla de pH.

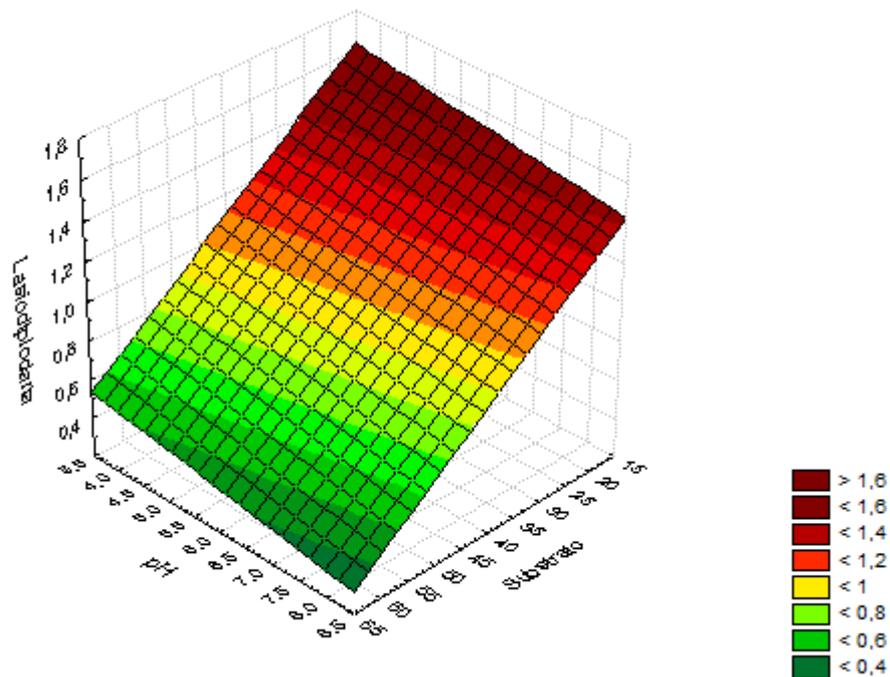


Figura 6 - Superfície de resposta para a produção de lasiodiplodana.
Fonte: Autoria própria.

Na Figura 6, observa-se que em condições de pHs mais alcalinos ($\text{pH} > 8$), associadas a elevadas concentrações do substrato melão de soja, há tendência de produção de menores quantidades de lasiodiplodana. Esta tendência pode ser verificada nos resultados do ensaio 3 do planejamento experimental, onde o pH inicial do meio foi ajustado para 8 e utilizado uma concentração de 60 g/L de melão de soja. Em tal ensaio foi verificado o menor valor de produção de lasiodiplodana (0,600 g/L).

Em contrapartida, os maiores valores de produção de lasiodiplodana (1,653 e 1,427 g/L) foram obtidos nos ensaios onde foram empregados 20 g/L de substrato, tanto em pH ácido (pH 4) quanto em pH alcalino (pH 8).

Elevadas produções de lasiodiplodana foram reportadas por Cunha et al. (2012) e Kagimura et al. (2015) em cultivo com o fungo *L. theobromae* MMPI em meio a base de glicose (20 g/L) empregando pH 5,5.

Cabe salientar que estudos prévios mostraram que concentrações de açúcar de 40 g/L ou superior levam ao surgimento de pigmento escuro no caldo de cultivo e na biomassa celular, possivelmente o que pode ser uma resposta a possível estresse celular frente a elevada pressão osmótica.

5.1.2 Avaliação do Rendimento em lasiodiplodana

Os efeitos principais e de interação entre as variáveis estudadas sobre o rendimento em lasiodiplodana estão apresentados a seguir na Tabela 4 e no gráfico de Pareto descrito na Figura 7.

Tabela 4 - Efeitos principais estimados sobre o rendimento em lasiodiplodana.

| Variáveis | Efeito | t calculado | P | L.C. (-95%) | L.C. (+95%) |
|----------------|-----------|-------------|----------|-------------|-------------|
| Média | 0,040740 | 5,07946 | 0,007083 | 0,018471 | 0,063009 |
| Substrato | -0,083878 | -3,69742 | 0,020882 | -0,146863 | -0,020893 |
| pH | -0,018493 | -0,81517 | 0,460727 | -0,081478 | 0,044493 |
| Substrato x pH | 0,014643 | 0,64546 | 0,553787 | -0,048343 | 0,077628 |

t tab: 2,776445; L.C: Limite de confiança.

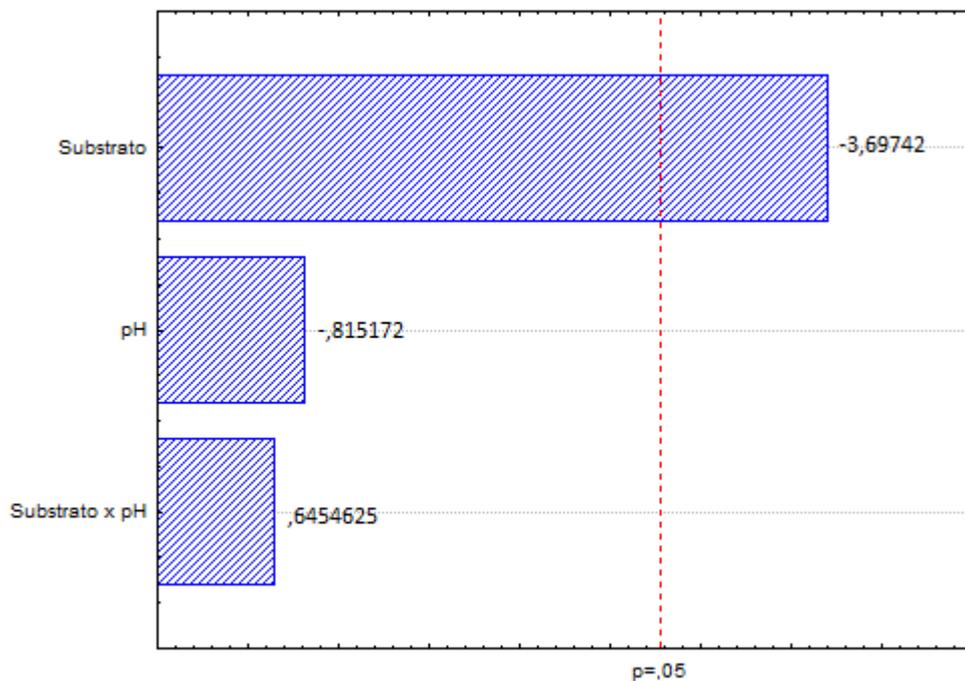


Figura 7 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados sobre o rendimento em lasiodiplodana.
Fonte: Autoria própria.

Conforme pode ser observado na Tabela 4 e Figura 7, a variável concentração de substrato apresentou efeito linear negativo, estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95% ($p<0,05$).

Similarmente ao observado com a produção de lasiodiplodana, a superfície de resposta da Figura 8, demonstram que o rendimento em lasiodiplodana é maior quando menores concentrações de substrato são empregadas. Entretanto, uma avaliação mais pontual dos ensaios do planejamento experimental (Tabela 2), sugere que melhores rendimentos são obtidos em concentrações de 20 g/L, tanto em pH ácido (ensaio 1, $Y_{P/S}$: 0,115 g/g) como em pH alcalino (ensaio 2, $Y_{P/S}$: 0,082 g/g).

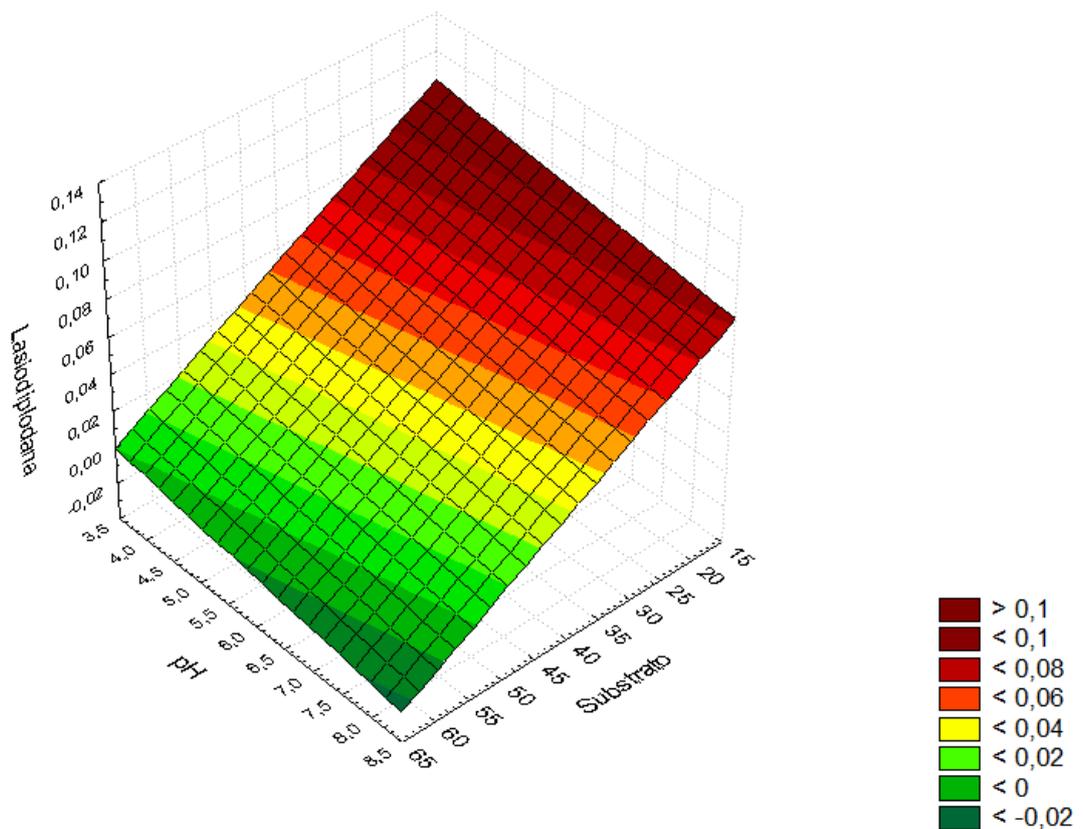


Figura 8 - Superfície de resposta para o rendimento em lasiodiplodana.
Fonte: Autoria própria.

Da mesma forma como verificado para a produção, o menor rendimento em lasiodiplodana foi observado no ensaio 3, conduzido em pH inicial ajustado a 8 e concentração de substrato de 60 g/L. Este comportamento indica que o microrganismo pode ter sua eficiência biossintética reduzida em condições extremas de pH e em elevadas concentrações de substrato. De fato, baixos rendimentos também foram verificados em concentrações de substratos superiores a 20 g/L, condições utilizadas nos ensaios 3 e 4, os quais apresentaram rendimento de 0,012 g/g e 0,016 g/g, onde

a concentração inicial do substrato foi de 60 g/L (pH 8) e 60 g/L (pH 4), respectivamente (Tabela 2). Comportamento similar foi descrito por Slivinski (2014), o qual reportou menor rendimento em lasiodiplodana em altas concentrações de substrato melaço de cana-de-açúcar.

Em contrapartida, valores de rendimento em lasiodiplodana superiores (0,25 g/g) foram verificados por Cunha et al. (2012), porém, os autores utilizaram MMV e glicose como fonte de carbono. O uso de glicose, um monossacarídeo de fácil assimilação pelo fungo, justifica os valores superiores verificados por tais autores em relação aos observados no presente estudo, os quais foram obtidos a partir do subproduto melaço de soja, rico em oligossacarídeos, sacarose, rafinose e estaquiose.

5.2 INFLUÊNCIA DO pH INICIAL E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO E RENDIMENTO EM BIOMASSA CELULAR

5.2.1 Avaliação da Produção de Biomassa Celular

Os resultados de produção, rendimento e produtividade de biomassa fúngica estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de produção, rendimento e produtividade volumétrica em biomassa celular.

| Experimentos | Valores codificados (reais) | | Resultado após 96 h de cultivo | | |
|--------------|--------------------------------------|---------|--|--|---|
| | Concentração (g.L ⁻¹) | pH | P _x (g.L ⁻¹) | Y _{x/s} (g.g ⁻¹) | Q _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
| 1 | - 1 (20) | - 1 (4) | 8,260 | 0,504 | 0,076 |
| 2 | - 1 (20) | + 1 (8) | 9,417 | 0,481 | 0,088 |
| 3 | + 1 (60) | + 1 (8) | 10,187 | 0,189 | 0,96 |
| 4 | + 1 (60) | - 1 (4) | 13,627 | 0,284 | 0,132 |
| 5 | 0 (40) | 0 (6) | 9,64 | 0,253 | 0,090 |
| 6 | 0 (40) | 0 (6) | 10,74 | 0,277 | 0,101 |
| 7 | 0 (40) | 0 (6) | 11,03 | 0,292 | 0,104 |
| 8 | 0 (40) | 0 (6) | 10,62 | 0,291 | 0,100 |

Os efeitos principais e de interação das variáveis sobre o crescimento micelial estão demonstrados na Tabela 6 e no gráfico de Pareto descrito na Figura 9.

Tabela 6 - Efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular.

| Variáveis | Efeito | t calculado | p | L.C. (-95%) | L.C. (+95%) |
|----------------|----------|-------------|----------|-------------|-------------|
| Média | 10,44000 | 55,58805 | 0,000001 | 9,91856 | 10,96144 |
| Substrato | 3,06833 | 5,77615 | 0,004461 | 1,59347 | 4,54320 |
| pH | -1,14167 | -2,14919 | 0,098070 | -2,61653 | 0,33320 |
| Substrato x pH | -2,29833 | -4,32662 | 0,012383 | -3,77320 | -0,82347 |

t tab: 2,776445; L.C: Limite de confiança.

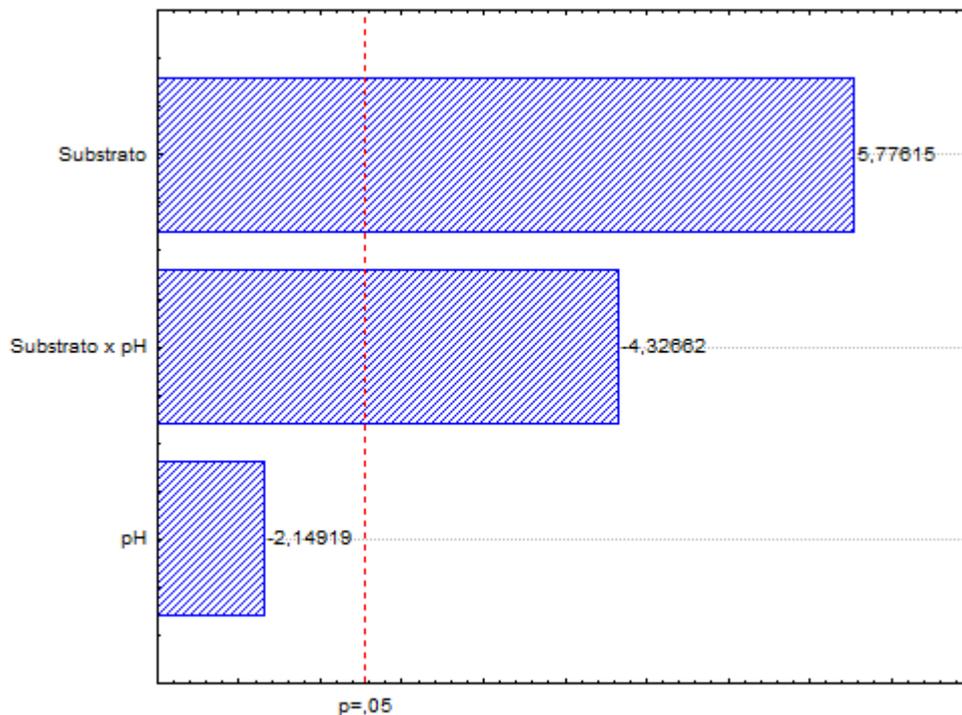


Figura 9 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção de biomassa celular.
Fonte: Autoria própria.

O fungo *L. theobromae* MMPI cresceu em todas as condições de cultivo, sendo verificado nos ensaios 6 (60 g/L, pH 4) e 4 (60 g/L, pH 8) os maiores valores de biomassa fúngica. Interessante destacar que nos ensaios 3 e 4 não foram verificados os melhores resultados em produção e rendimento em lasiodiplodana, sugerindo que não há uma íntima correlação entre crescimento celular e produção de exopolissacarídeo.

Contrariamente ao observado com a produção de lasiodiplodana, a variável substrato demonstrou efeito positivo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), indicando que o aumento na concentração de substrato contribui para o crescimento micelial.

Este fenômeno reforça a possibilidade de não haver correlação direta entre crescimento celular e produção do exopolissacarídeo.

A interação entre as variáveis concentração de substrato e pH inicial de cultivo apresentou efeito negativo ao mesmo nível de confiança. Indicando que para obtenção de melhores resultados de crescimento micelial é necessário trabalhar com maiores de concentrações de substrato associada a maiores valores de pH, ou ambas as variáveis nos níveis mais baixos.

O gráfico superfície de resposta (Figura 10), permite uma melhor visualização dos efeitos da concentração de substrato sobre a produção de biomassa celular. Maiores produções de biomassa celular são obtidas em concentrações de substrato superiores a 50 g/L, associada a um pH acima de 6.

Resultados similares aos verificados no presente estudo, também foram obtidos por Slivinski (2014), o qual também verificou tendência de maior produção de biomassa celular, pelo mesmo microrganismo, em concentrações elevadas do substrato melaço de cana-de-açúcar.

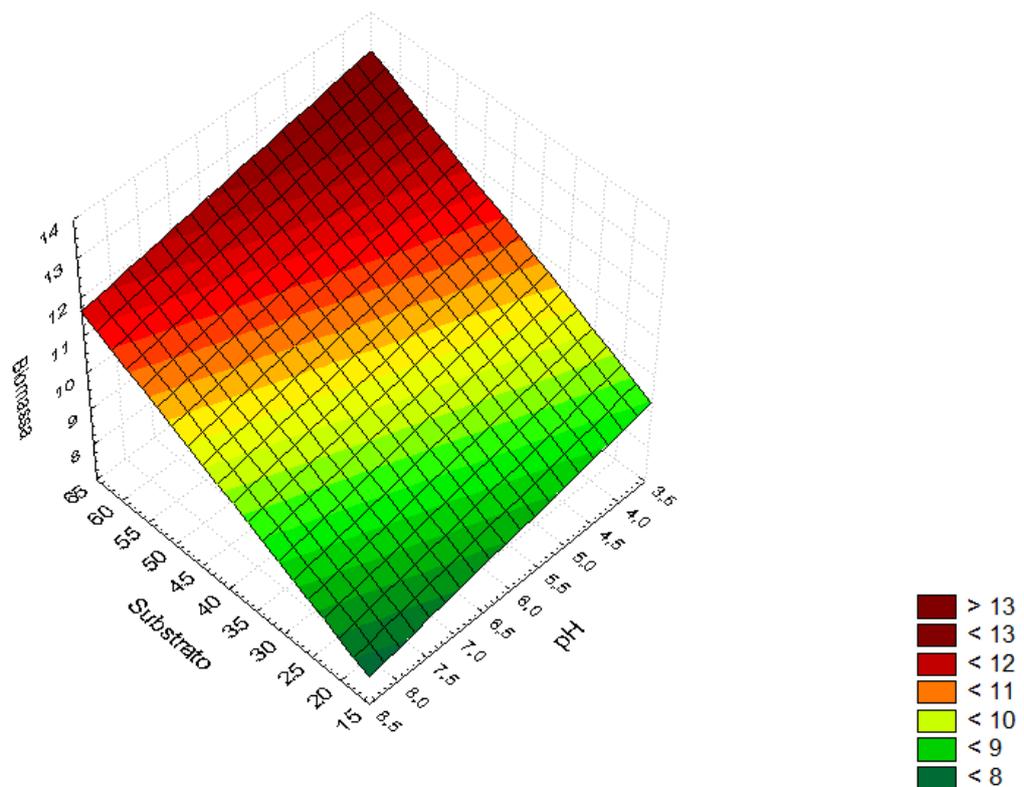


Figura 10 - Superfície de resposta para a produção de biomassa celular.
Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Avaliação do rendimento em Biomassa

Na Tabela 7, estão demonstrados os efeitos principais relativos ao rendimento em biomassa do fungo *L. theobromae* MMPI.

Tabela 7 - Efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular.

| Variáveis | Efeito | t calculado | p | L.C. (-95%) | L.C. (+95%) |
|----------------|-----------|-------------|----------|-------------|-------------|
| Média | 0,357185 | 14,02994 | 0,000150 | 0,286500 | 0,427870 |
| Substrato | -0,297864 | -4,13652 | 0,014417 | -0,497791 | -0,097937 |
| pH | -0,065779 | -0,91349 | 0,412666 | -0,265706 | 0,134148 |
| Substrato x pH | -0,031116 | -0,43212 | 0,687932 | -0,231043 | 0,168811 |

t tab: 2,776445; L.C: Limite de confiança.

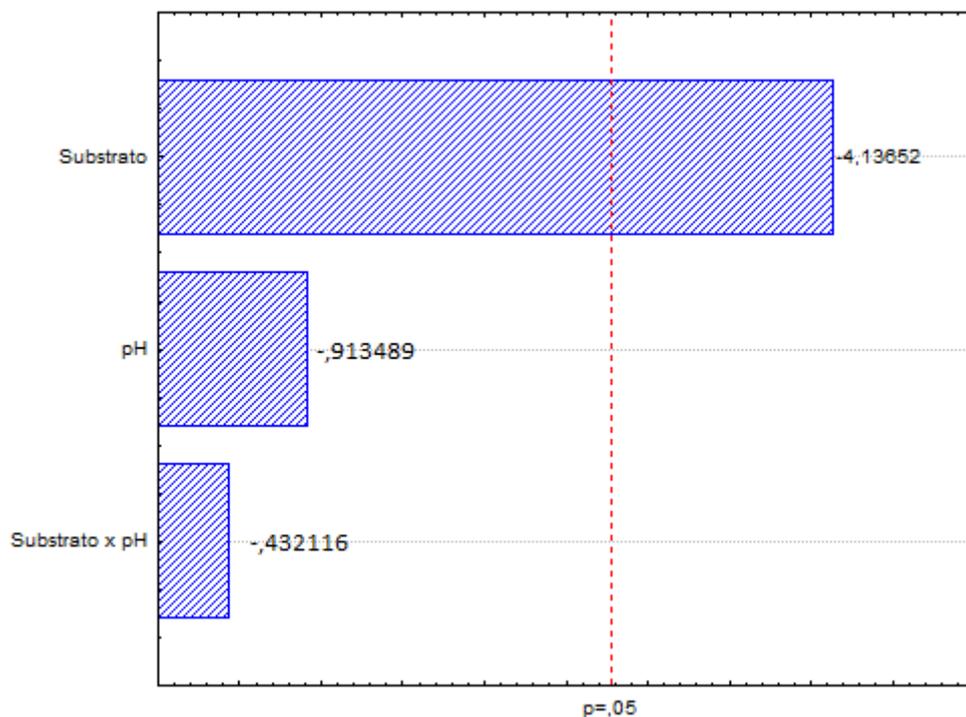


Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o rendimento em biomassa.

Fonte: Autoria própria.

Para o rendimento em lasiodiplodana, a variável concentração de substrato foi a única a apresentar efeito significativo, o qual foi negativo, ao nível de 95%, o gráfico de superfície de resposta (Figura 12) demonstram que em valores de pH ácido associada a menores concentrações de substrato, verifica-se uma tendência de obter maiores valores de rendimento em biomassa. Como pode ser observado na Tabela 5,

os ensaios 1 e 2 apresentaram os melhores rendimentos em biomassa e em ambos foi utilizada concentração de 20 g/L e valores de pH entre 4 e 8.

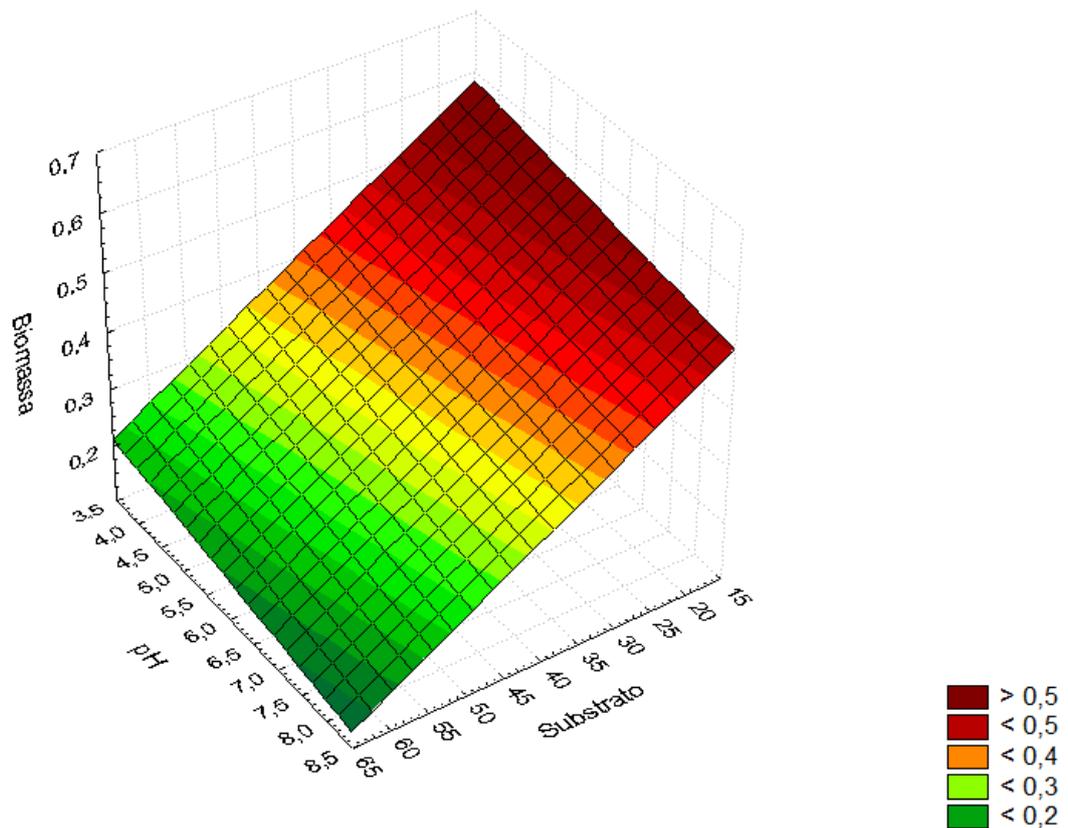


Figura 12 - Superfície de resposta para o rendimento em biomassa celular.
Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados obtidos pelo delineamento fatorial, assumiu-se como melhor condição para a produção de lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja, o uso de 20 g/L de concentração açúcares totais e pH inicial de meio de 5,5.

5.3 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA E BIOMASSA CELULAR

Na Tabela 8 e Figura 13, estão apresentados os parâmetros fermentativos obtidos durante o estudo cinético do cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI em meio a base de melaço de soja.

A produção de lasiodiplodana sofreu aumento gradativo durante o ensaio fermentativo, atingindo máxima produção em 96 horas de cultivo (0,89 g/L). Entretanto, esta máxima concentração de lasiodiplodana verificada em 96h de cultivo, não foi estatisticamente diferente daquelas verificadas nos demais tempos de cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 8.

O rendimento em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) se manteve constante durante as 96 horas de fermentação com valor de 0,05 g/g. Cunha et al. (2012), utilizando glicose como fonte de carbono, verificaram rendimento superior (0,25 g/g) para este mesmo polissacarídeo em meio a base de glicose.

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos observados no cultivo do *L. theobromae* MMPI.

| Parâmetros fermentativos | Valores | | | | |
|--------------------------|---------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | Tempo | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| P_X (g/L) | | 3,17 ^c | 6,15 ^b | 7,00 ^a | 7,33 ^a |
| P_F (g/L) | | 0,49 ^a | 0,67 ^a | 0,77 ^a | 0,89 ^a |
| ATR (g/L) | | 9,09 ^a | 5,99 ^{ab} | 4,31 ^b | 3,04 ^c |
| CS (g/L) | | 10,91 ^c | 14,01 ^b | 15,69 ^{ab} | 16,96 ^a |
| $Y_{P/S}$ (g/g) | | 0,05 ^a | 0,05 ^a | 0,05 ^a | 0,05 ^a |
| $Y_{X/S}$ (g/g) | | 0,29 ^b | 0,44 ^a | 0,45 ^a | 0,43 ^a |
| Y_e (g/g) | | 0,16 ^a | 0,11 ^a | 0,11 ^a | 0,12 ^a |
| Y_c (%) | | 54,53 ^c | 70,05 ^b | 78,46 ^{ab} | 84,80 ^a |
| Q_P (g/L h) | | 0,02 ^a | 0,01 ^{ab} | 0,01 ^b | 0,01 ^b |
| Q_X (g/L h) | | 0,10 ^a | 0,12 ^a | 0,09 ^b | 0,06 ^c |
| Q_S (g/L h) | | 0,45 ^a | 0,29 ^b | 0,22 ^c | 0,18 ^c |

Valores seguidos de mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). DMS: diferença mínima significativa. P_X : produção de biomassa, P_F : produção de lasiodiplodana, ATR: Açúcares totais residuais, CS: consumo de substrato, $Y_{P/S}$: conversão de substrato em lasiodiplodana, $Y_{X/S}$: conversão de substrato em biomassa, Y_e : rendimento específico, Y_c : percentual de consumo de substrato, Q_P : produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q_X : produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S : taxa global de substrato consumido.

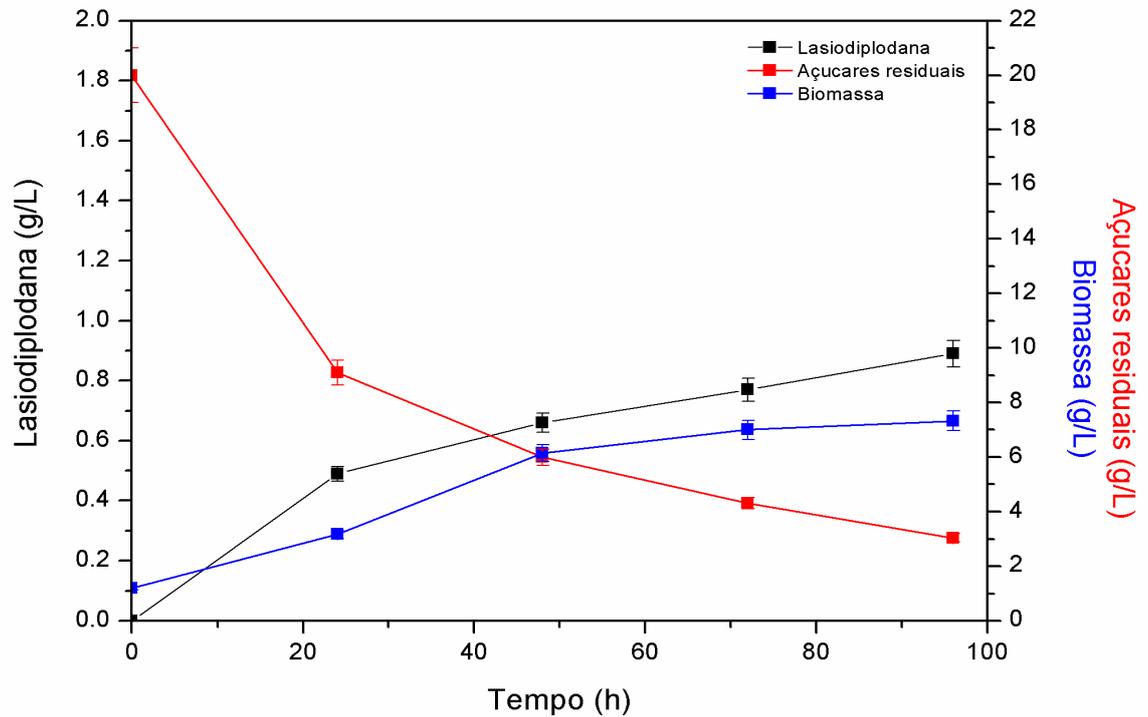


Figura 13 - Perfil fermentativo da produção de lasiodiplodana em meio a base de melão de soja.
Fonte: Autoria própria.

Em relação a biomassa fúngica, foi observada máxima produção em 96 horas (7,33 g/L) com rendimento de 0,43 g/g. Tais resultados são 47% superiores aos descritos por Kagimura et al. (2015), os quais obtiveram 3,82 g/L e 0,23 g/g, para produção e rendimento em biomassa, respectivamente, utilizando o monossacarídeo glicose (comercial) como fonte de carbono.

Em relação a capacidade de assimilação dos açúcares presentes no substrato melão de soja, o fungo foi eficiente em sua utilização. Nas primeiras 24 h de processo, já havia sido consumido 50% dos açúcares totais. Após este período, o substrato foi consumido de maneira gradativa até o final do processo (96 h), onde foi verificado máximo consumo de 16,96 g/L, correspondendo a um percentual de consumo de 84,8% do substrato (Y_c). O efetivo consumo do substrato indica que o fungo é produtor de enzimas que atuam sobre os oligossacarídeos presentes no substrato, cuja composição inclui grande concentração de oligossacarídeos, principalmente estaquiose e rafinose.

Resultados inferiores para consumo do substrato foram verificados por Cunha et al. (2012) e Kagimura et al. (2015), os quais verificaram respectivamente, 69,6% e 81% após 120 horas de cultivo, utilizando glicose como fonte de carbono.

A maior produtividade em lasiodiplodana foi verificada em 24 horas de cultivo (0,02 g/L h) e a máxima produtividade em biomassa em 48 horas (0,12 g/L h). Resultados superiores foram descritos por Cunha et al. (2012), os quais observaram 0,06 g/L h para lasiodiplodana e 0,14 g/L h para a biomassa.

6 CONCLUSÕES

O melão de soja demonstrou ser um substrato alternativo, eficiente e de baixo custo para a produção de lasiodiplodana e biomassa celular a partir do cultivo submerso do fungo *L. theobromae* MMPI.

Foram definidas como melhores condições de cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI em meio a base de melão de soja, para a produção de lasiodiplodana e crescimento micelial: 20 g/L de substrato, pH 5,5, 96 horas de tempo de cultivo a uma temperatura de 28 °C.

O fungo foi hábil na assimilação do substrato e crescimento celular no meio a base de melão de soja.

A produção de lasiodiplodana, utilizando o melão de soja como fonte de carbono foi afetada significativamente a um nível de 95% pela variável concentração de substrato, a qual demonstrou um efeito negativo.

O rendimento em lasiodiplodana, teve influência estatisticamente significativa a um nível 95%, da variável concentração de substrato, com efeito linear negativo.

A produção de biomassa micelial também foi influenciada ($p < 0,05$) pela variável concentração de substrato, com efeito linear positivo, e também teve efeito de interação entre as variáveis.

O estudo cinético do cultivo do *L. theobromae* MMPI em meio a base de melão de soja demonstrou que o fungo tem grande potencial para crescimento micelial e produção de lasiodiplodana. Máxima produção de lasiodiplodana foi observada em 96 horas (0,89 g/L), acompanhada de um percentual de assimilação de substrato (Y_C) de 84,8%, rendimento em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) de 0,05 g/g e produtividade volumétrica (0,01 g/L h).

REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI, L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29–42, 2004.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75–86, 2010.

BORGES, C. D.; MOREIRA, Â. N.; MOREIRA, A. DA S.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 327–332, 2004.

CALDEIRÃO, L.; TANAKA, C.; IDA, E.; SPINOSA, W. Modeling and kinetic study of bio-ethanol production from soy protein concentrate by-product. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, n. 2, p. 369–374, 2016.

CÂMARA, G. M. DE S. Introdução ao Agronegócio Soja. **LPV 584: Produção de Cana, Mandioca e Soja**, p. 1-29, 2015.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento Da Safra Brasileira Grãos. **Monitoramento agrícola- Safra 2017/18**, v. 5, n. 7, p. 1–139, 2018.

CUNHA, M. A. A. DA; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; BARBOSA, A. M.. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G.; CRUZ, C. H. G. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT4494. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 354–360, 2011.

FERNANDES, A. C.; PROENÇA, R. P. D. C. Técnicas Recomendadas Para Pré-Preparo De Feijão: Remolho E Descarte Da Água Recommended Techniques for Pre-Preparation of Bean: Soaking and Disposal of Water. **Nutrição em Pauta**, v. 19, n. 111, p. 50–56, 2011.

FREITAS, M. DE C. M. DE. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, p. 1–12, 2011.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A.; THEIS, T. V.; BARBOSA, A.; DEKKER, R. Production of the Exopolysaccharide Lasiodiplodan in a Stirred-Tank Bioreactor. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2015.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2015.

LOPES, A. L. C. Cultivo e Manejo da Soja. **Serviço Brasileiro de respostas Técnicas**, v. 2087, n. 48, p. 3338–3338, 2010.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631–650, 2008.

MALFATTI, C. R. M.; DOS SANTOS, F. S.; WOUK, J.; et al. Intracerebroventricular administration of the (1→6)- β -D-glucan (lasiodiplodan) in male rats prevents d-penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1289–1294, 2017.

MARGGRAF, A. Carboidratos. **Food Ingredients Brasil**, v. 20, p. 39–50, 2012.

MEYBODI, N. M.; MOHAMMADIFAR, M. A. Microbial Exopolysaccharides: A Review of Their Function and Application in Food Sciences. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 2, p. 112–117, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MISSÃO, M. R. Soja: Origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n. 1, p. 7–15, 2006.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47–57, 2008.

NUTRACÊUTICOS, R. F. E. A soja: história, tendências e virtudes. **Funcionais & Nutracêuticos**, v. 76, p. 28–40, 2007.

OLIVEIRA, M. A. DE; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; CAMPOS FILHO, P. J.; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/ cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 23–29, 2010.

PATIL, S. P.; SHIRSATH, L. P. Production of exopolysaccharide by an osmotolerant, thermostable and metal resistant *Bacillus subtilis*. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 2, p. 965–971, 2015.

PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; JUNIOR, A. A. B.; DEBIASI, H.; MANDARINO, J. M. G. Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria. **Comunicado Técnico 86 EMBRAPA**, p. 1–16, 2015.

QURESHI, N.; LOLAS, A.; BLASCHEK, H. P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 290–295, 2001. Nature Publishing Group.

SCHNEIDER, K. L. Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do melaço de soja de soja. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LÉON, J. A.; THOLOZAN, J.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008.

SLIVINSKI, J.; Estudo da Produção de Biopolímero E Biomassa Pelo Fungo *L. Theobromae* MMPI em Meio à Base de Melaço de soja de Cana-De-Açúcar Empregando Delineamento Fatorial. **Trabalho de conclusão de curso** (Departamento Acadêmico de Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SOMENSI, F. Y. K. Bioprodução de β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucana e Obtenção de Derivado por Carboximetilação Visando Atividade Biológica. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

STELUTI, R. M.; Produção e Caracterização Estrutural do Exopolissacarídeo Secretado Pelo Ascomiceto *Botryosphaeria* sp. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

STELUTI, R. M.; GIESE, E.C.; PIGGATO, M. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

THEIS, T. V.; CALEGARI, G. C.; SANTOS, V. A. Q.; JUNIOR, H. E. Z.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. Exocellular (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan (Lasiodiplodan): Carboxymethylation, Thermal Behavior, Antioxidant and Antimicrobial Activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19–33, 2017.

TÚRMINA, J.; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SANTOS, F. S.; SILVA, S. A.; MALFATTI, C. R. M. Toxicological Assessment of β -(1 \rightarrow 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298–14309, 2012.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; SILVA, M. L. C. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetic Bulletings**, v. 13, p. 42–43, 1954.