



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**



SILVIA BARBOSA PECIN

**MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO
MICROBIANA DE (1→6)-β-D-GLUCANA: AVALIAÇÃO DO MELAÇO
BRUTO E DO HIDROLISADO QUÍMICO**

DISSERTAÇÃO

**PATO BRANCO
2018**

SILVIA BARBOSA PECIN

**MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO
MICROBIANA DE (1→6)-β-D-GLUCANA: AVALIAÇÃO DO MELAÇO
BRUTO E DO HIDROLISADO QUÍMICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Co-orientadora: Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos

PATO BRANCO
2018

P365m Pecin, Silvia Barbosa.
Melaço de soja como substrato para produção microbiana de (1→6)-β-D-Glucana: avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico / Silvia Barbosa Pecin. – 2018.
65 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
Coorientadora: Profa. Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.
Bibliografia: f. 56 - 61.

1. Polissacarídeos. 2. Resíduos agrícolas. 3. Fermentação. I. Cunha, Mário Antônio Alves da, orient. II. Santos, Vidianny Aparecida Queiroz, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 80

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

Melaço de soja como substrato para a produção microbiana de (1→6)-β-D-glucana: avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico

Autora

Silvia Barbosa Pecin

Esta dissertação foi apresentada às 09 horas do dia 19 de dezembro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Mario Antonio Alves da Cunha UTFPR/PB
Orientador

Profa. Dra. Luciane Sene UNIOESTE/Cascavel
Examinadora

Prof. Dr. Márcio Barreto Rodrigues
UTFPR/PB
Examinador

Visto da Coordenação

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

RESUMO

PECIN, Silvia Barbosa. **MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO MICROBIANA DE (1→6)-β-D-GLUCANA: AVALIAÇÃO DO MELAÇO BRUTO E DO HIDROLISADO QUÍMICO**. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2018.

β-Glucanas são macromoléculas que apresentam inúmeras potencialidades biotecnológicas, e sua obtenção a partir de meios de cultivo a base de subprodutos agroindustriais, como o melaço de soja, é uma alternativa interessante para reduzir custos de processo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o melaço de soja como substrato para a produção de uma (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana) pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Melaço de soja não hidrolisado e hidrolisado foi estudado como substrato fermentativo. Inicialmente, o melaço foi caracterizado quanto aos conteúdos de glicose, frutose, sacarose, galactose, estaquiose e rafinose, composição proximal (proteínas, lipídios, resíduo mineral e umidade), teor de sólidos solúveis totais (°Brix), pH e conteúdo de compostos fenólicos totais. O melaço de soja bruto foi então clarificado e submetido a hidrólise química, para a sacarificação dos oligossacarídeos. Fermentações iniciais foram conduzidas em frascos agitados para avaliar a necessidade de suplementação nutricional do melaço de soja para a produção da lasiodiplodana. Ensaios de bioprodução utilizando melaço bruto e hidrolisado foram conduzidos em sistema submerso em incubadora orbital a 150 rpm, 28 °C durante 96 h. As amostras de lasiodiplodana obtidas em ambas as fermentações foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), análises termogravimétricas (TG, DTG, DTA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O melaço de soja demonstrou potencial como meio de cultivo, tanto para crescimento micelial, quanto para produção do exopolissacarídeo, não necessitando de suplementação nutricional. Os resultados também indicaram que não há necessidade de hidrólise prévia do melaço para a produção da lasiodiplodana. Maiores valores de produção final (0,41 g L⁻¹), rendimento (0,021 g L⁻¹) e produtividade volumétrica em lasiodiplodana (0,006 g L⁻¹ h) foram encontrados nos ensaios com melaço não hidrolisado. A análise térmica indicou que as duas amostras de lasiodiplodana apresentaram três estágios de perda de massa, a primeira ocorreu até 150 °C, seguida de dois eventos entre 250 °C e 525 °C. Os espectros de IV-TF de ambas as amostras de lasiodiplodana mostram sinais típicos de polissacarídeos entre 4000 e 400 cm⁻¹, especialmente em 1060 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹, os quais correspondem a vibração de alongamento simétrico de C-O-C (grupo característico de açúcares) e a vibração do anel de glicose, respectivamente. MEV revelou que as amostras de lasiodiplodana apresentam aspecto de filmes finos contendo muitos filamentos, dispostos de forma heterogênea e sobrepostos ao longo de toda a superfície do material.

Palavras-chave: exopolissacarídeo, lasiodiplodana, resíduo agroindustrial, fermentação

ABSTRACT

PECIN, Silvia Barbosa. **SOYBEAN MOLASSES AS A SUBSTRATE FOR MICROBIAL PRODUCTION OF (1→6)-β-D-GLUCAN: ASSESSMENT OF RAW AND CHEMICAL HYDROLYSATE SOYBEAN MOLASSES.** 2018. 65p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2018.

β-Glucans are macromolecules with innumerable biotechnological potentialities, and their production from agro-based by-products, such as soybean molasses, is an interesting alternative to reduce process costs. Thus, the objective of this work was to evaluate soybean molasses as substrate for the production of one (1→6)-β-D-glucan (lasiodiplodan) by the ascomycete *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Non-hydrolyzed and hydrolyzed soybean molasses were studied as a fermentation substrate. Initially, molasses were characterized as the content of glucose, fructose, sucrose, galactose, stachyose and raffinose, proximal composition (proteins, lipids, mineral residue and moisture), total soluble solids content (^oBrix), pH and content of total phenolic compounds. Crude soybean molasses were then clarified and subjected to chemical hydrolysis for saccharification of the oligosaccharides. Initial fermentations were conducted in agitated flasks to evaluate the need of nutritional supplementation of soybean molasses for lasiodiplodan production. Lasiodiplodan bioproduction assays using crude and hydrolyzed molasses were conducted in a submerged system in an orbital incubator at 150 rpm, 28 °C for 96 h. The lasiodiplodan samples obtained in both fermentations were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TG, DTG, DTA) and scanning electron microscopy (SEM). Soybean molasses showed potential as a cultivation medium for both mycelial growth and lasiodiplodan production, no needing of nutritional supplementation. The results also indicated that there is no needing for previous hydrolysis of molasses for the lasiodiplodan production. The highest values of final production (0.41 g L⁻¹), yield (0.021 g L⁻¹) and volumetric productivity in lasiodiplodan (0.006 g L⁻¹ h) were found in the non-hydrolyzed molasses assays. Thermal analysis indicated that both lasiodiplodan samples, presented three stages of mass-loss, the first stage occurred up to 150 °C, followed by two events between 250 °C and 525 °C. FT-IR spectra by both lasiodiplodan samples shows typical signs of polysaccharides between 4000 and 400 cm⁻¹ specially in 1060 cm⁻¹ and 1600 cm⁻¹, which correspond to the symmetrical stretching of C-O-C (characteristic group of sugars) and to the glucose ring vibration, respectively. SEM showed that lasiodiplodan samples have the appearance of thin films containing many filaments, heterogeneously arranged and superimposed over the material surface.

Keywords: exopolysaccharide, lasiodiplodan, agroindustrial residue, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular dos principais açúcares da soja: glicose (A), frutose (B), galactose (C), sacarose (D), rafinose (E) e estaquiose (F) | 13 |
| Figura 2 - Fluxograma de obtenção do melaço de soja | 15 |
| Figura 3 - Fluxograma do balanço de massa para processamento da soja | 16 |
| Figura 4 - Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI cultivado em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol | 23 |
| Figura 5 - Figura 5 - Aspecto do melaço de soja bruto (A), clarificado (B), resíduo de clarificação (C) e hidrolisado (D) | 27 |
| Figura 6 - Fluxograma do processo de bioprodução de lasiodiplodana | 30 |
| Figura 7 – Identificação de compostos fenólicos no melaço de soja bruto (A), clarificado (B) e hidrolisado (C), por CLAE | 38 |
| Figura 8 - Conteúdos de açúcares no meio de melaço de soja sem suplementação (A) e com suplementação (B) | 43 |
| Figura 9 - Perfil da fermentação do melaço de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) em meio não suplementado | 44 |
| Figura 10 - Consumo dos açúcares pelo fungo <i>L. theobromae</i> MMPI utilizando melaço de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) durante a fermentação | 47 |
| Figura 11 - Espectro de infravermelho (IV-TF) da LAS (A) e LAS-H (B) | 48 |
| Figura 12 - Curvas de TG das amostras LAS e LAS-H | 49 |
| Figura 13 - Curvas DTG das amostras LAS e LAS-H | 50 |
| Figura 14 - Curvas DTA das amostras LAS e LAS-H | 50 |
| Figura 15 - Micrografias da LAS e LAS-H obtidas por MEV. (A) LAS em aumento de 200 X, (B) LAS em aumento de 2000 X, (C) LAS-H em aumento de 200 X, (D) LAS-H em aumento de 2000 X | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|---|
| Tabela 1 - Principais potencialidades biológicas descritas na literatura científica para lasiodiplodana | 2 |
| Tabela 2 - Composição química do melão de soja | 3 |
| Tabela 3 - Parâmetros fermentativos da produção de lasiodiplodana em melão de soja sem e com suplementação após 72h | 4 |
| Tabela 4 - Parâmetros fermentativos da fermentação do melão de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) em meio não suplementado | 4 |
| Tabela 5 - Conteúdo de perda de massa das amostras de LAS e LAS-H em intervalos de temperatura determinados | 5 |
| Tabela 6 - Dados de solubilidade da LAS e LAS-H em água a 25 °C | 5 |
| | 2 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico) |
| ANOVA | Análise de variância |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| CS | Com suplementação |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| DRX | Difração de raios-X |
| DTA | Análise térmica diferencial |
| DTG | Análise termogravimétrica derivada |
| EPS | Exopolissacarídeo |
| EtOH | Etanol |
| FRAP | Potencial redutor do íon férrico |
| GAE | Equivalentes em ácido gálico |
| IV-TR | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier |
| KBr | Brometo de potássio |
| LAS | Lasiodiplodana obtida em meio de cultivo melão de soja |
| LAS-H | Lasiodiplodana obtida em meio de cultivo melão de soja hidrolisado |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| MG | Minas Gerais |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| SS | Sem suplementação |
| T0 | Tempo inicial |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TF | Tempo final |
| TGA | Análise termogravimétrica |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 12 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 12 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 3.1 SOJA..... | 13 |
| 3.1.1 Melaço de Soja..... | 14 |
| 3.2 Hidrólise química..... | 17 |
| 3.3 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS..... | 18 |
| 3.3.1 β -Glucanas..... | 19 |
| 4.1 MICRORGANISMO E MATÉRIA-PRIMA..... | 24 |
| 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 25 |
| 4.2.1 Caracterização do melaço de soja..... | 25 |
| 4.2.1.1 Determinação de açúcares..... | 25 |
| 4.2.1.2 Determinação de proteínas totais..... | 26 |
| 4.2.1.3 Determinação de lipídeos..... | 26 |
| 4.2.1.4 Determinação dos conteúdos de umidade e resíduo mineral fixo..... | 26 |
| 4.2.1.5 Determinação do pH..... | 27 |
| 4.2.2 Clarificação do melaço bruto..... | 27 |
| 4.2.3 Hidrólise química..... | 29 |
| 4.2.4 Ensaio fermentativo..... | 29 |
| 4.2.4.1 Preparo e padronização do Inóculo..... | 29 |
| 4.2.5 Produção biotecnológica da lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja..... | 29 |
| 4.2.5.1 Efeito da suplementação nutricional do melaço de soja..... | 30 |
| 4.2.5.2 Bioprodução da lasiodiplodana em meio de melaço de soja não suplementado..... | 31 |
| 4.2.6 Parâmetros Fermentativos..... | 32 |
| 4.2.7 Ensaio de caracterização da lasiodiplodana..... | 33 |
| 4.2.7.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF)..... | 34 |
| 4.2.7.2 Análise térmica..... | 34 |
| 4.2.7.3 Análise da solubilidade em água..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura..... | 35 |
| 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA..... | 36 |
| 5.1.1 Caracterização química do melaço de soja..... | 36 |
| 5.2 PRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA..... | 41 |
| 5.2.1 Efeito da suplementação do meio de cultivo a base de melaço de soja bruto e clarificado na biossíntese de lasiodiplodana..... | 41 |
| 5.2.2 Produção de lasiodiplodana em melaço hidrolisado e não hidrolisado..... | 43 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA..... | 48 |
| 5.3.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF)..... | 48 |
| 5.3.3 Análise Térmica..... | 49 |
| 5.3.4 Análise da solubilidade em água..... | 52 |
| 5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 53 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 55 |
| REFERÊNCIAS..... | 56 |

1 INTRODUÇÃO

As β -glucanas são biomacromoléculas que tem despertado o interesse de diferentes setores industriais, por apresentarem diversas funcionalidades biotecnológicas. Tais moléculas são reconhecidas como modificadores da resposta biológica e muitas apresentam potencial antioxidante, anticarcinogênico, antiviral e anticoagulante. Além disso, algumas atuam como eliciadores de resistência em plantas e podem também ser utilizadas como modificadores de textura e viscosidade em cosméticos e produtos alimentícios.

Tais macromoléculas têm sido comercialmente extraídas da parede celular de cereais, como aveia e cevada, e de microrganismos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A extração de glucanas de parede celular tem custo relativamente elevado, sendo utilizadas diferentes soluções extratoras, incluindo álcalis, solventes orgânicos e água quente. O processo de extração da parede celular pode levar a degradação parcial da macromolécula e comumente as glucanas extraídas de parede celular contém material proteico agregado a macromolécula. No entanto, alguns microrganismos têm a capacidade de produzir extracelularmente β -glucanas quando cultivados em sistemas submersos. Neste processo, a macromolécula pode ser facilmente recuperada por precipitação alcoólica, seguida de filtração ou centrifugação, sem sofrer danos consequentes das etapas de extração da parede celular.

A lasiodiplodana, uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana extracelular produzida pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, apresenta diversas funcionalidades biológicas como atividade antioxidante, hipocolesterolêmica e antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7. O fungo *L. theobromae* MMPI tem demonstrado eficiência na produção de lasiodiplodana a partir de substratos como glicose e sacarose. Os custos de uma produção comercial, poderiam ser reduzidos com o uso de subprodutos e biomassas co-geradas em processos agroindustriais.

O melaço de soja é uma biomassa co-gerada no processo de extração de proteínas da soja para a produção de concentrado proteico, e encerra em sua composição carboidratos como glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiase, os quais podem ser aproveitados como substratos em bioprocessos.

Considerando as elevadas concentrações dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose no melão de soja, é suposto que processos de sacarificação poderiam viabilizar ou aumentar a eficiência do uso desta biomassa como substrato em bioprocessos. Neste contexto, o presente estudo propôs avaliar o subproduto melão de soja como substrato para a produção biotecnológica da lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Melão de soja foi avaliado nas formas bruta (não hidrolisada) e hidrolisada e os exopolissacarídeos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização do melão de soja não hidrolisado e submetido à hidrólise química, como substrato alternativo para a produção biotecnológica da lasiodiplodana ((1→6)- β -D-glucana) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar quimicamente o melão de soja bruto (*in natura*) quanto aos conteúdos de glicose, frutose, sacarose, estaquiose e rafinose; composição proximal (proteínas, lipídios, resíduo mineral e umidade); teor de sólidos solúveis totais; pH, e compostos fenólicos totais;
2. Avaliar a necessidade de suplementação nutricional do melão para produção de lasiodiplodana;
3. Obter hidrolisado de melão de soja via hidrólise química empregando ácido sulfúrico como catalisador;
4. Conduzir fermentações descontínuas usando meio a base de melão de soja não hidrolisado e hidrolisado por via química, para avaliar e comparar o desempenho de cada sistema;
5. Caracterizar as amostras de lasiodiplodana produzidas nos diferentes meios de cultivo por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), análises termogravimétricas (DTA, TGA, DTG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), e solubilidade.

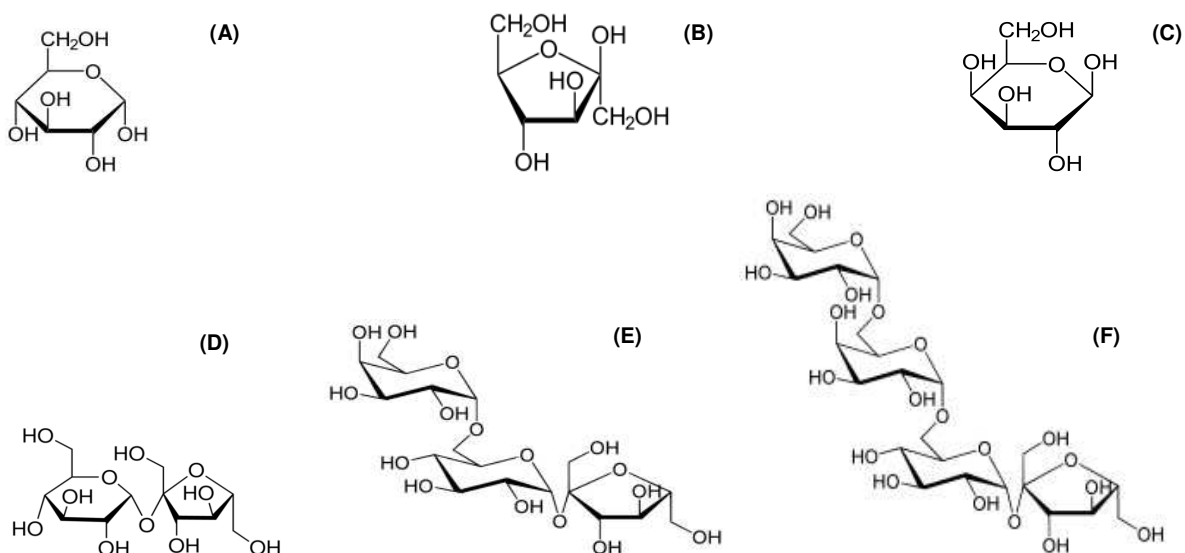
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SOJA

A soja é uma leguminosa cujo grão contém cerca de 34% de proteínas, 31% de carboidratos, 22% de lipídeos, 5% de resíduo mineral e 8% de umidade (GONÇALVES et al., 2014). Dentre os carboidratos presentes no grão, destacam-se a glicose, frutose, galactose, sacarose, estaquiase, rafinose, melibiose, ramnose e maltopentose.

A estaquiase (Figura 1) é um tetrassacarídeo composto por quatro moléculas de hexoses (galactose + galactose + glicose + frutose), já a rafinose é um trissacarídeo composto por três moléculas de hexoses (galactose + glicose + frutose), (NELSON; COX, 2002). A sacarose é um dissacarídeo não redutor, hidrolisável por soluções diluídas de ácidos minerais ou por enzimas, com liberação de glicose e frutose (MACHADO, 1999).

Figura 1 - Estrutura molecular dos principais açúcares da soja: glicose (A), frutose (B), galactose (C), sacarose (D), rafinose (E) e estaquiase (F)



Fonte: Autoria própria.

No Oriente, a soja é utilizada como um importante produto alimentício há milhares de anos. No Ocidente, em contrapartida, a maior parte da soja produzida é destinada à produção de óleo e farelo de soja, o qual apesar do elevado valor nutricional, é utilizado principalmente na elaboração de ração animal, sendo apenas uma pequena quantidade destinada a alimentação humana (SANTOS et al., 2018).

No entanto, o uso da soja para a alimentação humana tem aumentado significativamente nos mercados ocidentais devido as potencialidades bioativas e nutricionais destacadas na literatura científica, especialmente em relação aos teores proteicos e de isoflavonas (CEDERROTH; NEF, 2009; GONÇALVES et al., 2014).

A soja é um dos principais produtos agrícolas cultivados no Brasil, tornando o país um dos maiores produtores mundiais, que juntamente com os Estados Unidos e a Argentina somam 82% da produção mundial. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, na safra de 2017/2018, foram produzidas no Brasil 119 milhões de toneladas de soja e a previsão para safra de 2018/2019 será superior a 119 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

A soja é um grão muito versátil e origina diversos produtos e subprodutos, os quais são utilizados em diversos setores industriais (IMCOPA, 2016). Na indústria alimentícia, os principais derivados de soja incluem o óleo de soja, margarina e gordura vegetal, farinha desengordurada, proteína texturizada, extrato hidrossolúvel (leite de soja), queijo (*tofu*), lecitina e o molho fermentado (*shoyu*). Na agroindústria, o farelo de soja é bastante utilizado na elaboração de ração animal devido aos elevados teores de fibras e proteínas. Além disso, derivados de soja como casca, óleo, álcool e melaço de soja podem ser utilizados como substrato para a geração de energia para a indústria (IMCOPA, 2016).

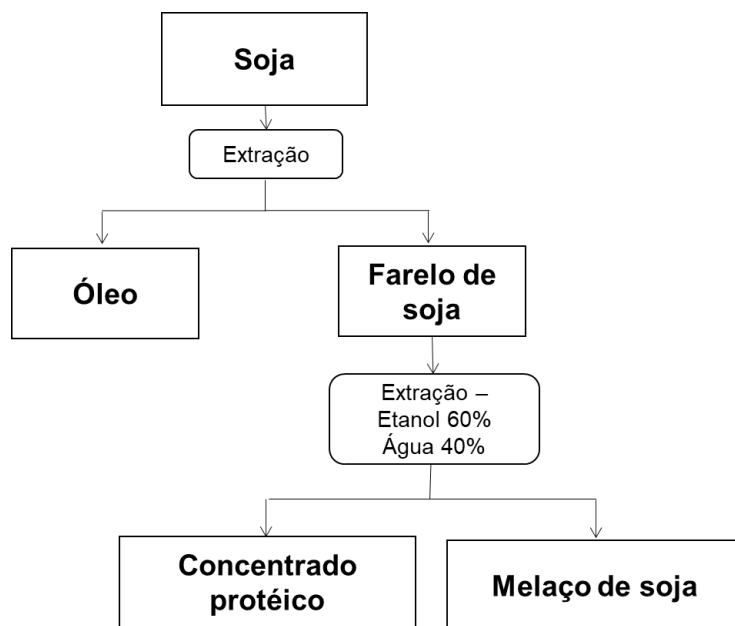
3.1.1 Melaço de Soja

O melaço de soja é um xarope viscoso, de cor marrom e sabor agridoce (LOMAN; JU, 2016), gerado durante a obtenção do extrato proteico de soja. O processo de produção do extrato proteico envolve uma etapa de extração, com solução etanólica 60% (v/v), a qual insolubiliza as proteínas e fibras da soja, que são então retiradas e desidratadas, sendo obtido a proteína concentrada de soja. A

fração líquida resultante da extração retém os açúcares da soja, os quais após recuperação do etanol por evaporação, originam o melaço de soja (SIQUEIRA et al, 2008).

O processo de obtenção do melaço de soja está descrito na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma de obtenção do melaço de soja

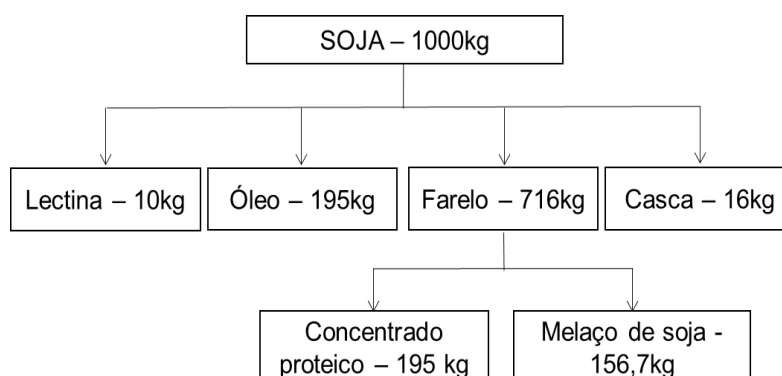


Fonte: Adaptado de Siqueira (2007).

Aproximadamente 57,3% da massa seca do melaço corresponde a carboidratos, contendo principalmente sacarose (28,4%), estaquiose (18,6%) e rafinose (9,68%), além de lipídios (21,2%), proteínas (9,44%), fibras (5,7%) e cinzas (6,36%) (SIQUEIRA et al, 2008).

De acordo com a estimativa de produção de soja da CONAB para a safra 2018/2019 e seguindo o balanço de massa referente ao processamento da soja (Figura 3), a produção de melaço será de aproximadamente 18 milhões de toneladas no respectivo período.

Figura 3 – Diagrama esquemático do balanço de massa do processamento da soja



Fonte: Adaptado de Siqueira (2007).

O aproveitamento de subprodutos agroindustriais como matéria-prima para a obtenção de produtos com valor agregado é uma interessante alternativa para redução do descarte de resíduos poluentes no ambiente, além de ser uma forma de valorização econômica do subproduto (DAMASCENO et al., 2003).

Os elevados teores de carboidratos presentes no melaço de soja tornam essa biomassa atrativa para aplicações em diferentes bioprocessos industriais, podendo contribuir para a redução dos custos de processo (BRAUNEGG et al., 2004).

Entretanto, essa biomassa ainda é pouco valorizada e tem sido utilizada basicamente como suplemento na alimentação animal, e grande parte ainda é descartada como resíduo. Na alimentação animal, o melaço de soja tem sido utilizado como ingrediente em misturas para a elaboração de ração, como auxiliar de peletização ou adicionado ao farelo ou a casca de soja (CHAJUSS, 2004).

A utilização do melaço de soja como substrato eficiente para a obtenção de diferentes bioprodutos de interesse industrial como o etanol (SIQUEIRA et al., 2008; DA SILVA et al., 2012, LETTI et al., 2012 ROMÃO et al., 2012,), goma xantana (CANUTO, 2006), enzimas (BARBOSA et al., 2014; MORAIS JUNIOR et al., 2016, SALMON et al., 2016); ácido oleico (SOLAIMAN et al. 2007); biossurfactantes (RODRIGUES et al., 2017) e hidrogênio por fotofermentação de bactérias púrpuras (MOREIRA et al., 2016) tem sido demonstrada na literatura científica.

Este subproduto pode ser utilizado tanto na forma bruta, quanto após tratamento prévio com agente químico ou enzimático para aumentar as concentrações de açúcares fermentescíveis disponíveis ao metabolismo microbiano.

3.2 Hidrólise química

O processo de hidrólise química consiste na quebra de carboidratos complexos como é o caso dos açúcares de longas cadeias poliméricas, tais como amido, celulose e hemicelulose, e também açúcares menores, incluindo estaquiose, rafinose e sacarose em açúcares simples como glicose, maltose, frutose e xilose (ANWAR et al., 2014; JÖNSSON; MARTÍN, 2016). A reação de hidrólise química (ácida) é promovida por um catalisador ácido diluído, em concentrações que podem variar de soluções fracas a soluções ácidas concentradas, normalmente sob aquecimento e pressões controladas (GURGEL, 2010).

A hidrólise química quando realizada utilizando ácidos concentrados exige temperaturas na faixa de 40 °C, sendo verificados rendimentos próximos a 90% em relação a produção teórica de glicose. Porém, o consumo de ácido é alto, a recuperação e a reciclagem do ácido são dispendiosas e ainda, podem ocorrer corrosões nos equipamentos utilizados (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A hidrólise com ácidos fortes diluídos, por outro lado, é caracterizada por um reduzido consumo de ácidos e tempos curtos de reação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), porém, exige condições operacionais severas de pH (1 e 2) e temperatura (100 e 150 °C) (SANTIAGO et al., 2004). A utilização de ácidos diluídos apresenta benefício econômico, devido ao baixo consumo de ácido e aos reduzidos custos com matéria-prima, além da menor corrosividade dos equipamentos (GURGEL, 2010).

Os ácidos sulfúrico e clorídrico são os mais comumente empregados em processos de hidrólise química, porém ácido fluorídrico, acético, nítrico e fosfórico também podem ser utilizados (CARDONA et al., 2010; XIANG, 2002).

A utilização de melão de soja *in natura* e melão de soja hidrolisado com ácido sulfúrico, como substrato para a produção de etanol foi estudada por

Schneider (2016), onde foi verificado maior consumo do substrato para a biossíntese de etanol quando utilizado o melão hidrolisado quimicamente.

Romão et al. (2012) avaliaram a utilização de melão de soja em diferentes condições de hidrólise para a produção de etanol por fermentação submersa. Estes autores avaliaram o uso de ácido clorídrico, nítrico e sulfúrico, a proporção de melão de soja e tempo de hidrólise e verificaram que o melão diluído em proporção de 1:4 (m/m), durante 20 minutos, com uso de ácido nítrico foram as melhores condições para a disponibilização de açúcares fermentescíveis e maior produtividade de etanol.

Siqueira (2007) avaliou os ácidos nítrico, fosfórico, sulfúrico e clorídrico como catalisadores na hidrólise de melão de soja, visando o aumento dos açúcares fermentescíveis para a produção de etanol por diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. O ácido sulfúrico foi selecionado como mais adequado para a sacarificação do melão de soja. Ausência de diferença significativa na eficiência de hidrólise entre estes ácidos foi descrita por Letti (2007), onde foi avaliada a hidrólise do melão de soja para posterior produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

3.3 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Polissacarídeos microbianos são biopolímeros produzidos por diferentes tipos de bactérias e fungos, que desempenham diversas funções nas células microbianas, dependendo de onde estão localizados (SUTHERLAND, 1990). Biopolímeros de parede celular, como as glucanas, tem função estrutural e aqueles sob a forma de grânulos intracelulares, tem função de reserva energética. Por outro lado, os biopolímeros em forma de cápsula tem função de proteção celular contra desidratação e aqueles excretados para o meio extracelular, os exopolissacarídeos (EPS) tem função de reserva energética (PACE, 1991; DONOT et al., 2012).

Devido à grande diversidade estrutural e biotecnológica, estas macromoléculas têm inúmeras aplicações industriais, especialmente nos setores de alimentos, farmacêutico e químico, onde são utilizadas como floculantes, encapsulantes, espessantes, estabilizantes, emulsificantes e também como agentes

de geleificação e emulsificação (SUTHERLAND, 1990; SELITRENNIKOFF, 1995; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Possuem ainda, interessantes propriedades biológicas, como atividade imunomoduladora, antitumoral, antiviral e anti-inflamatória (CUNHA et al., 2017).

Exopolissacarídeos microbianos obtidos por fermentação submersa são uma interessante alternativa às gomas de origem vegetal, especialmente pela similaridade em relação às propriedades físico-químicas, bem como pela maior facilidade de recuperação e purificação quando comparada aos processos de extração de polímeros de parede celular (PACE, 1991).

As principais fontes de carbono utilizadas na produção de EPS por fermentação microbiana submersa incluem a glicose e a sacarose, porém, algumas fontes alternativas têm sido destacadas como substratos promissores, como é o caso dos resíduos agroindustriais, dentre os quais destacam-se o melaço de cana de açúcar, soro de leite e resíduos da indústria de soja (NITSCHKE et al., 1997; CHIMILOVSKI et al., 2011; BLANDÓN et al., 2018).

3.3.1 β -Glucanas

As glucanas são polímeros de glicose estruturados de forma ordenada e classificados quanto ao tipo de ligação na cadeia principal, que pode ser do tipo α ou β (SILVA et al., 2006; CUNHA et al., 2017). São componentes estruturais da parede celular de fungos filamentosos e leveduras (VASCONCELOS et al., 2008), cuja função específica na fisiologia microbiana ainda não está completamente elucidada, mas pode ser considerada como uma estrutura auxiliar na manutenção da rigidez da parede celular juntamente com a quitina e glicoproteínas (SILVA et al., 2006).

Entre os diferentes tipos de glucanas descritas na literatura científica, destaca-se a lasiodiplodana, que é uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana produzida extracelularmente pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, quando o mesmo é cultivado por fermentação submersa em meio rico em açúcares (VASCONCELOS et al., 2008).

A biossíntese de lasiodiplodana pelo *L. theobromae*, bem como suas características físicas, químicas e biológicas são afetadas diretamente pelas

condições de processo utilizadas, as quais incluem a aeração do meio de cultivo, pH inicial, temperatura de incubação e especialmente os tipos e concentrações de fontes de carbono e nitrogênio utilizadas (CUNHA et al., 2012).

Cunha et al. (2012), avaliou o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose e sacarose) e nitrogênio (extrato de levedura, peptona, ureia, peptona, nitrato de potássio e sulfato de amônio) na eficiência de produção de lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Estes autores verificaram os maiores valores de produção de lasiodiplodana nos ensaios conduzidos utilizando glicose e maltose como fontes de carbono e ureia e extrato de levedura como fontes de nitrogênio.

Este tipo de glucana ((1→6)-β-D-glucana) também podem ser isolada da parede celular de cereais e de leveduras, mas o processo de obtenção envolve etapas complexas de extração com a utilização de solventes como o hexano para a remoção de lipídios; tratamento com água quente e fria e com álcalis (NaOH), seguido de neutralização com soluções ácidas (CORRADI DA SILVA et al., 2008; PENGKUMSRI et al., 2017). Já a lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana), uma vez que é secretada extracelularmente para o meio de cultivo, pode ser recuperada por precipitação com etanol, de forma mais rápida e simples e com reduzidos custos de processo (CUNHA et al., 2012; CALEGARI et al., 2017).

A lasiodiplodana tem sido descrita na literatura científica como uma macromolécula que apresenta inúmeras potencialidades biotecnológicas. Na Tabela 1, estão descritas as principais propriedades bioativas, descritas até o momento, para amostras lasiodiplodana nativa e amostras de lasiodiplodana submetidas a derivatizações química.

Tabela 1 - Principais potencialidades biológicas descritas na literatura científica para lasiodiplodana

| Lasiodiplodana | Condições de cultivo | Propriedade biológica | Efeito observado | Referência |
|-----------------------|---|------------------------------|--|---------------------|
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (40 e 60 g L ⁻¹); 28 °C; 96 h, frascos agitados (200 rpm) e biorreator STR (400 rpm) | Atividade antiproliferativa | Ausência de citotoxicidade e efeito antiproliferativo contra células de câncer de mama (MCF-7) | Cunha et al. (2012) |
| Lasiodiplodana | Condições de cultivo | Propriedade biológica | Efeito observado | Referência |

| dana | cultivo | biológica | cia | |
|--------------------------|---|--|--|-------------------------|
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (40 g L ⁻¹); 28 °C; 96 h, biorreator STR (400 rpm) | Efeito hipoglicêmico | Redução nos níveis glicêmicos por tratamento de camundongos, por gavagem, com lasiodiplodana | Turmina et al. (2012) |
| Nativa e carboximetilada | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹) 28 °C; 72 h, biorreator STR (400 rpm) | Atividade antioxidante | Remoção dos radicais DPPH e ABTS; Poder redutor do íon ferro em ensaios <i>in vitro</i> | Kagimura et al. (2015b) |
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹) 28 °C; 72h, biorreator STR (400 rpm) | Atividade antioxidante | Remoção dos radicais OH•, O ₂ ^{•-} e NO•; poder redutor em ensaios <i>in vitro</i> | Giese et al. (2015) |
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; 96h, frascos agitados (150 rpm) | Atividade antitumoral | Efeito antiproliferativo contra células de câncer de mama (MCF-7) | Queiroz et al. (2015) |
| Nativa e sulfonada | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; 72 h, frascos agitados (150 rpm) | Atividade antioxidante | Remoção dos radicais peróxido, hidroxila, DPPH e ABTS; poder redutor do íon ferro <i>in vitro</i> | Calegari et al. (2017) |
| | | Atividade antimicrobiana | Efeito microbicida e microbiostático | |
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; 72 h, frascos agitados (150 rpm) | Efeito DNA-protetivo e anti-inflamatório | Efeito protetor contra danos ao DNA e a processo inflamatórios em camundongos induzidos por doxorubicina | Mello et al. (2017) |

| Lasiodiplodana | Condições de cultivo | Propriedade biológica | Efeito observado | Referência |
|--------------------------|---|--|---|----------------------------|
| Nativa | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; 72 h, frascos agitados (150 rpm) | Prevenção de neurotoxicidade e induzida por D-penicilamina | Efeito protetivo contra danos oxidativos de inibição de GABAérgica que projetam os neurônios GABAérgicos para o hipocampo | Malfatti et al. (2017) |
| | | Prevenção de lipoperoxidação o no córtex cerebral | Redução significativa na produção de TBARS e sinais comportamentais convulsivos e pré-convulsivos | |
| Nativa e carboximetilada | Meio mínimo de Vogel; glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; , 72h, biorreator STR (180 rpm) | Atividade antioxidante | Remoção dos radicais peróxido, hidroxila, DPPH e ABTS; poder redutor do íon ferro em ensaios <i>in vitro</i> | Theis et al. (2017) |
| | | Atividade antimicrobiana | Determinação da concentração mínima inibitória | |
| Nativa e acetilada | Meio mínimo de Vogel e glicose (20 g L ⁻¹); 28 °C; 72h, frascos agitados (150 rpm) | Atividade antioxidante | Remoção dos radicais peróxido, hidroxila, DPPH e ABTS; poder redutor do íon ferro em ensaios <i>in vitro</i> | Sanches Luna et al. (2018) |

Conforme demonstrado na Tabela 1, lasiodiplodana tem sido produzida em meio mínimo de sais de Vogel e glicose como fonte de carbono.

A utilização de substratos alternativos para a obtenção desta biomolécula de elevado potencial bioativo, com menores custos de processo, visando ainda aumentar o rendimento de produção, é uma alternativa interessante.

A bioprodução de lasiodiplodana utilizando substratos alternativos como melaço de cana de açúcar e bagaço de cana, já foi avaliada por Slivinski (2014) e Phillipini (2017), respectivamente.

Slivinski (2014) avaliou a produção de lasiodiplodana pela cepa *L. theobromae* MMPI utilizando melaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Neste estudo, foi verificado que o fungo foi hábil em utilizar os açúcares presentes no melaço para crescimento micelial e biossíntese de lasiodiplodana, sendo verificados máximos valores de biomassa de 9.84 g L⁻¹ e de lasiodiplodana de 8,62 g L⁻¹.

Recentemente, Phillipini (2017) avaliou a produção de exopolissacarídeo, utilizando a cepa *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 em meio a base de hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho, e verificou produção de, respectivamente, 7,8 e 5,73 g L⁻¹ de exopolissacarídeo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E MATÉRIA-PRIMA

O melaço de soja empregado no preparo dos meios de cultivo foi gentilmente fornecido pela empresa Selecta, localizada em Araguari, Minas Gerais.

A amostra foi acondicionada em recipientes de polietileno de 2L, os quais foram armazenados em freezer horizontal (Electrolux, modelo 310), a -18 °C, para utilização durante o desenvolvimento dos experimentos. Para evitar possíveis variações na composição do substrato, todos os experimentos foram conduzidos a partir de uma amostra “mãe”, que foi descongelada a temperatura ambiente, aquecida a 50 °C e homogeneizada por agitação.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) foi mantido em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol por repiques sucessivos e armazenado sob refrigeração a 5 °C.

Os reagentes foram adquiridos comercialmente com grau de pureza adequado aos experimentos.

Figura 4 – Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol



Fonte: Autoria própria.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Caracterização do melão de soja

O melão de soja bruto (*in natura*) foi caracterizado quanto aos conteúdos de açúcares totais; teores de glicose, frutose, galactose, sacarose, estaquiose e rafinose; composição proximal (proteínas, lipídios, resíduo mineral e umidade); sólidos solúveis totais, pH e compostos fenólicos totais.

4.2.1.1 Determinação de açúcares

O conteúdo de açúcares totais foi determinado pelo método Fenol-Sulfúrico (Dubois, 1956) utilizando curva padrão de glicose (apêndice A). Os resultados foram expressos em g L^{-1} .

Os açúcares glicose, frutose, galactose, sacarose, estaquiose e rafinose foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram analisadas em cromatógrafo 920 LC (VARIAN Inc., Walnut Creek, CA, EUA), equipado com detector de índice de refração e coluna HPX-87-H (Bio-Rad, Hercules, CA) a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando como fase móvel uma solução diluída de ácido sulfúrico ($0,005\text{ mol L}^{-1}$) com fluxo de $0,6\text{ mL min}^{-1}$ em modo isocrático e volume de injeção de $20\text{ }\mu\text{L}$. O melão de soja foi adequadamente diluído e filtrado em filtros de PVDF Chromafil com diâmetro de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e em cartucho Sep-Pack C_{18} para remoção de interferentes, em especial de compostos fenólicos. Os açúcares foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos de cada açúcar, cujas curvas padrão estão apresentadas no apêndice B. Os resultados foram expressos em g L^{-1} .

O $^{\circ}\text{Brix}$ foi determinado em refratômetro de bancada por medição direta, sem prévia diluição da amostra.

4.2.1.2 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela AOAC (2016). Tal método baseia-se na determinação da quantidade de nitrogênio orgânico total, e consiste em etapas de digestão ácida e básica, onde o nitrogênio é transformado em um sal de amônia. Em seguida, a amostra é destilada e com o uso de vermelho de metila como indicador, a quantidade de nitrogênio presente é quantificada por titulometria. O conteúdo de nitrogênio obtido foi convertido em concentração de proteínas, utilizando o fator de conversão 6,25. Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹ de melão de soja.

4.2.1.3 Determinação de lipídeos

A concentração de lipídeos foi determinada pelo método de Soxhlet conforme metodologia descrita pela AOAC (2016). O método consiste na solubilização da fração lipídica com o uso de solvente orgânico (éter de petróleo ou éter etílico) com refluxo durante 4 horas. Após a extração, o solvente é evaporado e o conteúdo de lipídeos é determinado gravimetricamente. Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹ de melão de soja.

4.2.1.4 Determinação dos conteúdos de umidade e resíduo mineral fixo

O teor de umidade foi determinado por análise gravimétrica após secagem da amostra a 105 °C até massa constante. O conteúdo mineral também foi quantificado por análise gravimétrica após incineração da amostra a 550 °C durante 5 horas (AOAC, 2016).

4.2.1.5 Determinação do pH

O pH foi determinado em pHmetro de bancada por medição direta, sem prévia diluição da amostra.

4.2.1.6 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999), utilizando como referência, curva padrão de ácido gálico apresentada no apêndice C. O método consiste na mistura de uma alíquota (0,5 mL) da amostra, apropriadamente diluída, com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10. A mistura é deixada em repouso por período de 3 a 8 minutos e em seguida, são adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio (4%). Então, os tubos são incubados em ausência de luz durante 2 horas e em seguida, a absorbância é determinada em 740 nm. Os resultados de conteúdo de fenólicos verificados no melaço de soja foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE mL⁻¹).

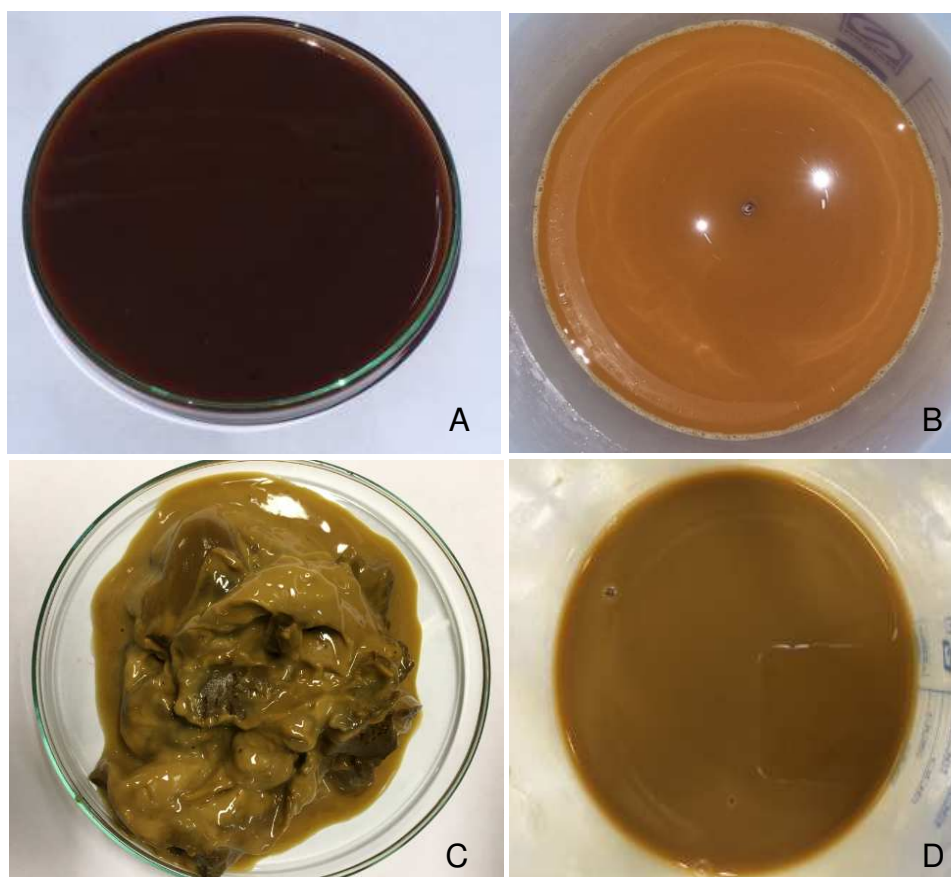
A identificação dos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram conduzidas em cromatógrafo 920 LC (VARIAN Inc., Walnut Creek, CA, EUA), equipado com detector PDA e coluna C18 (Bio-Rad, Hercules, CA) a 30 °C, utilizando como fase móvel A, uma solução de água ultrapura acidificada com ácido fosfórico (pH 2,16) e fase B, acetonitrila. Os fenólicos foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos.

4.2.2 Clarificação do melaço bruto

O melaço de soja (Figura 5) foi submetido a clarificação para remoção de impurezas visando melhor aproveitamento do material. Considerando que o melaço bruto tem elevada viscosidade, foi primeiramente diluído em água destilada, na

proporção de 1:4 (melaço de soja: água) sob agitação constante e em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o pH do melaço de soja foi ajustado para 3,0 com adição de ácido sulfúrico concentrado, sendo então, submetido a agitação constante durante 24 horas sob refrigeração (4 °C). Posteriormente, foi centrifugado (1500 x g, 30 min) e o pH do sobrenadante ajustado para 5,5 com solução de NaOH 6 mol L⁻¹, sendo novamente centrifugado, conforme protocolo utilizado por Slivinski (2014).

Figura 5 - Aspecto do melaço de soja bruto (A), clarificado (B), resíduo da clarificação (C) e hidrolisado(D)



Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Hidrólise química

A hidrólise química foi realizada seguindo metodologia descrita por Romão et al. (2012). O melaço clarificado teve seu pH ajustado para 3 com solução de ácido sulfúrico ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$) e então, foi submetido a aquecimento em autoclave a $127 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $1,5 \text{ atm}$ de pressão, durante 30 minutos. Em seguida, o melaço foi resfriado até temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (6 mol L^{-1}).

4.2.4 Ensaio fermentativos

4.2.4.1 Preparo e padronização do Inóculo

A cepa fúngica (*L. theobromae* MMPI) foi ativada transferindo uma alçada do micélio de cultura estoque para placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol, as quais foram incubadas em estufa de cultura a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96 horas.

Para o preparo do inóculo, o micélio crescido nas placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1954) e glicose (5 g L^{-1}). Os frascos foram incubados por 48 horas a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante (180 rpm). Em seguida, a pré-cultura foi homogeneizada assepticamente em mixer por 30 segundos e então, o homogeneizado de células foi centrifugado e os fragmentos de micélio foram ressuspensos em água destilada esterilizada. A suspensão micelial foi padronizada por diluição até obtenção de leituras de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm em espectrofotômetro UV-VIS Digilab-HitachiU-2800 (Lambda Advanced Technology, UK) (STELUTI et al. 2004).

4.2.5 Produção biotecnológica da lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja

4.2.5.1 Efeito da suplementação nutricional do melaço de soja

Foram conduzidos ensaios de bioprodução da lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* utilizando melaço de soja (não hidrolisado) com e sem suplementação nutricional para avaliar o efeito da suplementação nutricional na biossíntese de lasiodiplodana. Nos ensaios com suplementação, foi utilizado extrato de levedura (2 g L⁻¹) como fonte de nitrogênio e fosfato de potássio dibásico (2 g L⁻¹) e sulfato de magnésio heptahidratado (2 g L⁻¹) como suplemento mineral.

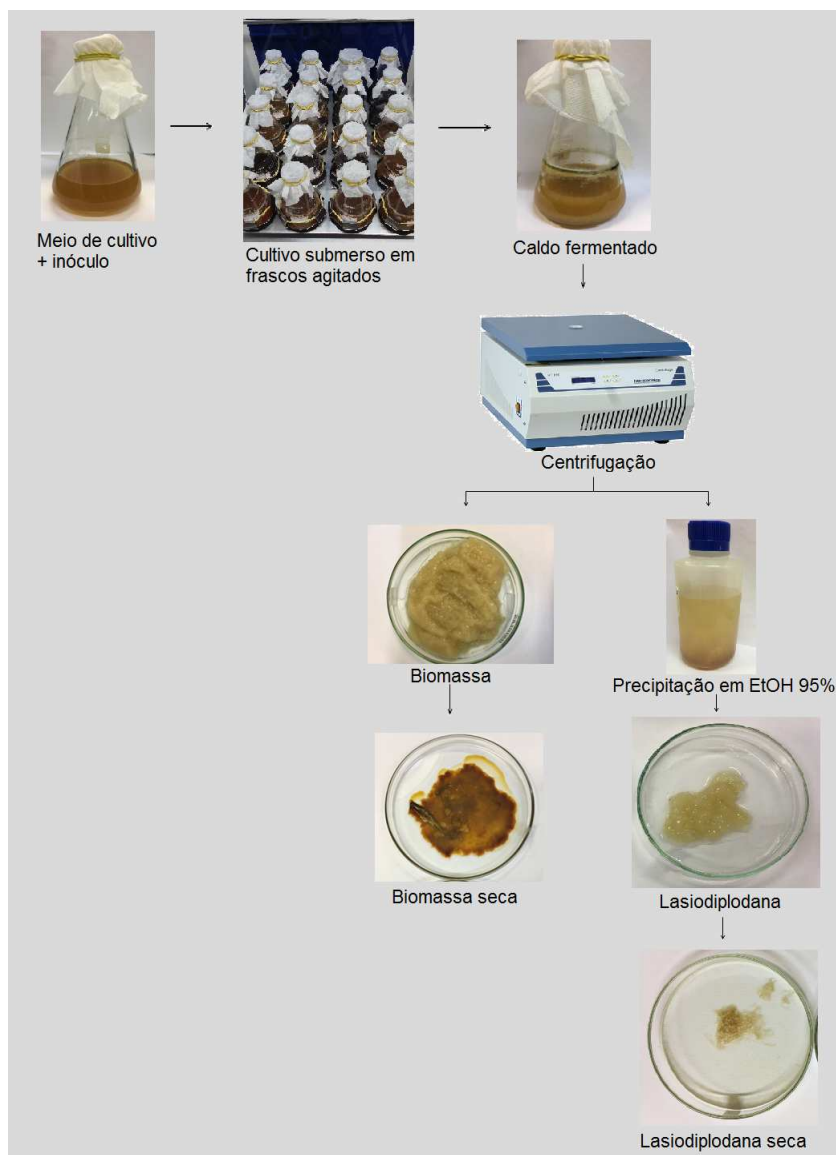
Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, composto por 90 mL de melaço de soja contendo 20 g L⁻¹ de açúcares totais (suplementado ou não) e 10 mL de inóculo previamente padronizado, conforme descrito no item 4.2.4.1. Os frascos foram incubados em agitador orbital (*shaker*), sob agitação constante de 150 rpm, durante 72 h, a 28 °C, conforme descrito por Cunha et al. (2012).

Nestes ensaios foram determinadas a concentração de biomassa fúngica, lasiodiplodana e açúcares totais, conforme Figura 6.

No final do processo, o caldo fermentado foi separado da biomassa micelial por centrifugação (1500 x g) durante 30 minutos; a biomassa foi intensamente lavada com água destilada a 60 °C até completa remoção dos resíduos de meio fermentativo e lasiodiplodana. Em seguida, a biomassa foi seca em estufa a 50 °C até massa constante.

A lasiodiplodana foi separada do caldo fermentativo por precipitação com três volumes de etanol (95%) a 4 °C, (*overnight*), e então foi seca em estufa a 50 °C. até massa constante. Ambos os conteúdos de biomassa e lasiodiplodana foram quantificados gravimetricamente.

Figura 6 - Fluxograma do processo de bioprodução da lasiodiplodana



Fonte: Autoria própria.

4.2.5.2 Bioprodução da lasiodiplodana em meio de melão de soja não suplementado

Fermentações em frascos agitados foram conduzidas para avaliar a fermentabilidade e comparar o processo de produção da lasiodiplodana em melão de soja (hidrolisado e não hidrolisado) sem suplementação mineral e de nitrogênio. Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados por 96 horas, 28 °C, 150 rpm, e

com concentração de açúcares totais iniciais no melão de soja de aproximadamente 20 g L⁻¹. O volume de melão foi de 90 mL e o de inóculo padronizado de 10 mL.

A cada 24 horas foram avaliadas os conteúdos de biomassa fúngica, lasiodiplodana, pH e açúcares residuais. Nestes ensaios a lasiodiplodana foi quantificada após intensa diálise contra água (6 dias), usando membrana de celulose (MWCO 12.000 DA; 1.3 in. diam., Sigma-Aldrich, EUA). Foram determinados os parâmetros fermentativos dos cultivos descritos abaixo.

4.2.6 Parâmetros Fermentativos

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

O $Y_{P/S}$ foi determinado pela relação entre a quantidade de lasiodiplodana produzida (ΔP) e a correspondente variação do substrato (ΔS), onde (P_f) corresponde a produção final, P_i à produção inicial e S_i e S_f aos substratos inicial e final, respectivamente:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)}$$

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

O $Y_{X/S}$ foi determinado pela relação entre a quantidade de biomassa produzida (ΔX) e a correspondente variação do substrato (ΔS), onde (X_f) corresponde a produção final, X_i à produção inicial e S_i e S_f aos substratos inicial e final, respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

c) Produtividade volumétrica em lasiodiplodana (Q_P)

A Q_P foi determinada pela razão entre a quantidade de lasiodiplodana produzida ($P_f - P_i$) e o intervalo do tempo correspondente (Δt):

$$Q_p = \frac{(P_f - P_i)}{\Delta t}$$

d) Produtividade volumétrica em biomassa celular (Q_x)

A Q_p foi determinada pela razão entre a quantidade de biomassa produzida ($X_f - X_i$) e o intervalo do tempo correspondente (Δt):

$$Q_x = \frac{(X_f - X_i)}{\Delta t}$$

e) Consumo global de substrato (Q_s)

A Q_s foi determinada pela razão entre a quantidade de substrato consumido ($X_f - X_i$) e o intervalo do tempo correspondente (Δt):

$$Q_s = \frac{(S_f - S_i)}{\Delta t}$$

f) Percentual de consumo de substrato (Y_c)

O Y_c foi determinado pela relação entre o conteúdo de substrato consumido ao longo da fermentação ($S_f - S_i$) e o conteúdo inicial do mesmo (S_i):

$$Y_c = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} \times 100$$

4.2.7 Ensaio de caracterização da lasiodiplodana

Amostras de lasiodiplodana produzidas em meio de melão de soja hidrolisado e não hidrolisado após diálise e secagem por liofilização foram submetidas as análises de espectroscopia no infravermelho, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura e análise de solubilidade. As amostras foram codificadas como LAS (lasiodiplodana obtida a partir de melão não hidrolisado) e LAS-H (lasiodiplodana obtida a partir de melão hidrolisado).

4.2.7.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF)

Amostras LAS e LAS-H foram avaliadas por espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) em espectroscópio Frontier (Perkin Elmer, EUA) na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com 32 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} . Foi utilizado o método de discos de KBr com concentração final de amostra de 1% , conforme Kagimura et al. (2015b).

4.2.7.2 Análise térmica

Amostras liofilizadas de LAS e LAS-H foram submetidas à Análise Termogravimétrica (TGA), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimétrica Derivada (DTG), utilizando equipamento analisador térmico SDT Q600 (TA instruments, EUA). A perda de massa foi acompanhada entre 26 °C e 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e ar sintético com fluxo de 50 mL minuto^{-1} , (Kagimura et al. (2015b).

4.2.7.3 Análise da solubilidade em água

Para avaliar a hidrossolubilidade das amostras de lasiodiplodana (LAS e LAS-H) foi utilizado protocolo descrito por Wang et al. (2012) com adaptações. Inicialmente as amostras (100 mg) foram ressuspensas em água destilada (25 mL) sob agitação constante, em temperatura de 25 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação (3000 X g/15 minutos) e o sobrenadante foi coletado para a avaliação do conteúdo de açúcares totais, que foi determinado pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O conteúdo de açúcares totais foi relacionado com a quantidade de carboidratos solúveis, considerando o grau de pureza da lasiodiplodana (95 % de carboidratos).

4.2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia superficial das amostras de lasiodiplodana. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de bancada TM3000 (Hitachi, EUA) a partir das amostras liofilizadas de LAS e LAS-H, com ampliações de 200 X e 2000 X.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os dados foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey para comparação das médias, utilizando o software Statistica 7.0. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA

5.1.1 Caracterização química do melaço de soja

Os resultados das análises de caracterização do melaço de soja bruto e dos melaços clarificado e hidrolisado estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química do melaço de soja

| Composição proximal | Melaço de soja bruto | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------|--|--|--|--|--|
| | g 100 g ⁻¹ | | | | | |
| Carboidratos totais | 59,80 * | | | | | |
| Proteínas | 7,57 | | | | | |
| Lipídeos | 6,02 | | | | | |
| Umidade | 15,40 | | | | | |
| Resíduo mineral (cinzas) | 11,26 | | | | | |
| Sólidos solúveis totais (°Brix) | 73 | | | | | |

| Composição em açúcares | Melaço de soja | | | | | |
|------------------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|
| | Bruto | | Clarificado | | Clarificado e hidrolisado | |
| | g.L ⁻¹ | % | g.L ⁻¹ | % | g.L ⁻¹ | % |
| Glicose | 13,26 ^a | 4,28 | 11,64 ^b | 4,24 | 11,85 ^b | 4,52 |
| Frutose | 1,99 ^b | 0,64 | 1,83 ^c | 0,67 | 3,88 ^a | 1,48 |
| Galactose | 9,53 ^b | 3,09 | 8,72 ^c | 3,18 | 18,56 ^a | 7,08 |
| Sacarose | 74,51 ^a | 24,04 | 64,53 ^b | 23,55 | 17,39 ^c | 6,63 |
| Rafinose | 96,58 ^c | 31,16 | 104,07 ^b | 37,97 | 160,86 ^a | 61,34 |
| Estaquiose | 114,02 ^a | 36,79 | 83,28 ^b | 30,39 | 49,71 ^c | 18,95 |
| Total | 309,89^a | 100 | 274,07^b | 100 | 262,25^c | 100 |

| Fenólicos totais | mg GAE g ⁻¹ | | |
|------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|
| | Bruto | Clarificado | Clarificado e hidrolisado |
| | 0,36 ^b | 0,32 ^c | 0,90 ^a |

* Carboidratos totais obtidos por diferença.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autoria própria.

O melão de soja bruto mostrou ser uma biomassa rica em carboidratos, incluindo monossacarídeos como frutose ($1,99 \text{ g L}^{-1}$), galactose ($9,53 \text{ g L}^{-1}$) e glicose ($13,26 \text{ g L}^{-1}$), e oligossacarídeos como sacarose ($74,51 \text{ g L}^{-1}$), rafinose ($96,58 \text{ g L}^{-1}$) e estaquiose ($114,02 \text{ g L}^{-1}$), com destaque para sacarose, rafinose e estaquiose. Os mesmos monossacarídeos e oligossacarídeos também foram relatados por Siqueira et al. (2008) e Romão et al. (2012) em amostras melão de soja.

O conteúdo de carboidratos correspondeu a 59,80% da composição proximal da amostra de melão de soja bruto, indicando que de fato o melão de soja apresenta os carboidratos como principais componentes de sua constituição. Resultados similares em conteúdo de carboidratos (53,20%) foram encontrados por Mantovani (2013) em melão de soja gerado por companhia agroindustrial localizada na região sul do Brasil.

Em relação ao conteúdo de açúcares totais estimados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), valores similares aos verificados no presente estudo ($309,89 \text{ g L}^{-1}$) foram descritos por Rodrigues et al. (2017), os quais encontraram teores de $309,2 \text{ g L}^{-1}$.

Interessante notar os conteúdos apreciáveis de proteínas totais presentes no melão de soja ($7,57 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$), uma vez que resíduos agroindustriais de origem vegetal comumente são pobres em proteínas, entretanto em virtude da soja ser uma oleaginosa rica em proteínas, o subproduto melão de soja agrega certo conteúdo proteico. Quantidades de $6,44 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de proteínas foram encontradas por Romão et al. (2012) em melão de soja gerado pela mesma companhia agroindustrial que forneceu o melão estudado no presente trabalho. Valores um pouco superiores foram observados por Siqueira et al. (2008) e Zhong; Zhao (2015), os quais caracterizaram melões de soja gerados no Brasil e na China, reportando valores de $9,44 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e $11,7 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$.

A fração lipídica presente no melão de soja varia bastante entre diferentes amostras, devido a especificidades do processo industrial de beneficiamento da soja para a produção do concentrado proteico e do óleo de soja. Nas amostras aqui estudadas foram encontrados teores de $6,02 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, sendo estes superiores aos descritos por Mantovani (2013) que reportou $2,8 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Por outro lado, é inferior aos valores reportados por Romão et al. (2012) e Siqueira et al. (2008), os quais verificaram conteúdos de $15,6$ e $21,2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Outro aspecto interessante da composição do melão de soja é o elevado conteúdo mineral (11,36 g 100g⁻¹), o que poderia contribuir para o enriquecimento nutricional de meios de cultivo a base de melão de soja. Resultados um pouco inferiores de resíduo mineral fixo (6,35 g 100g⁻¹) foram reportados por Guedes et al. (2015) em melão de soja gerado em companhia agroindustrial localizada em Araucária, Paraná (Brasil).

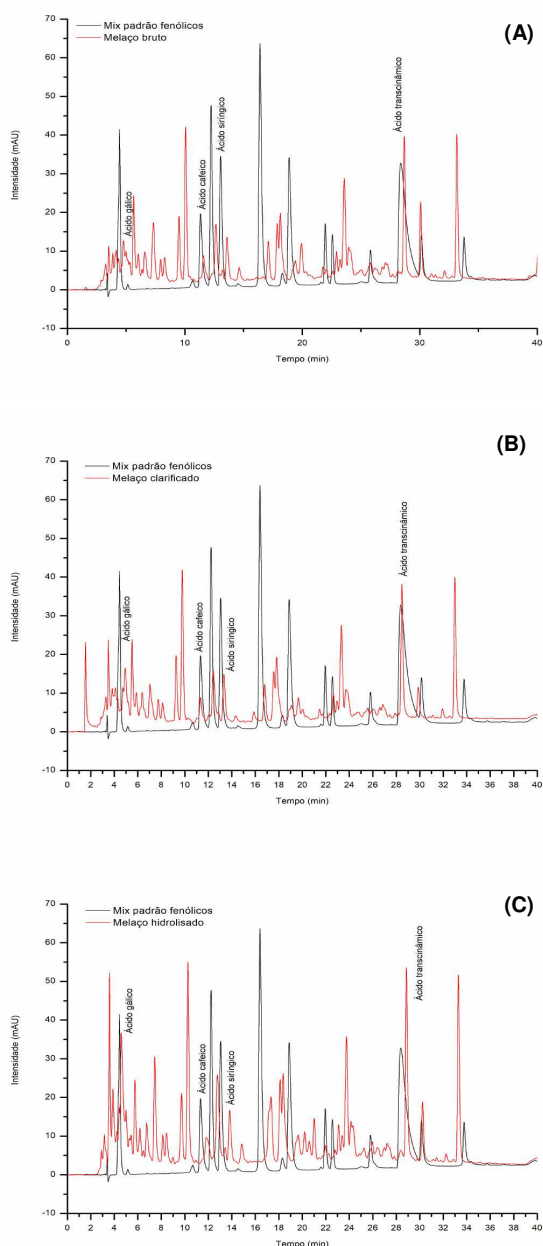
Devido principalmente a elevada concentração de carboidratos totais presentes no melão de soja, altos teores de sólidos solúveis totais (73 °Brix) foram verificados. Valores similares (72,5 °Brix) foram reportados no trabalho publicado por Guedes et al. (2015), onde é destacado que a massa de sólidos totais é comumente assumida como sendo toda matéria livre de água. Entretanto os resultados de seu trabalho indicam que o teor dos sólidos medidos em refratômetro não se refere apenas a fração de sólidos solúveis, mas descrevem o conteúdo de sólidos totais da amostra de melão de soja.

A determinação de compostos fenólicos em substratos alternativos é importante para avaliar a toxicidade do meio sobre o microrganismo que será utilizado no bioprocessamento. Para reduzir seus efeitos tóxicos, processo de detoxificação e clarificação são comumente realizados para remoção parcial destes interferentes (ANTUNES et al., 2017 b; GUPTA et al., 2017).

O melão de soja estudado apresentou quantidades de 0,90 mg GAE g⁻¹ de fenólicos totais, o que é bastante superior aos valores reportados por Zhong; Zhao (2015) (0,0121 mg GAE g⁻¹) em melão de soja não clarificado. Conforme pode ser verificado na Figura 7, foi observado a presença de vários compostos fenólicos nas amostras de melão de soja bruto (não clarificado), clarificado e hidrolisado, e sendo identificado ácido gálico, ácido cafeico, ácido siringico e ácido transcinâmico.

O pH do melão de soja bruto foi de 6,5.

Figura 7 – Identificação de compostos fenólicos no melão de soja bruto (A), clarificado (B) e hidrolisado (C), por CLAE



Fonte: Autoria própria.

O processo de clarificação do melão de soja, usando modificação de pH e centrifugação, reduziu significativamente o conteúdo fenólicos totais (Tabela 2). Embora o conteúdo de fenólicos totais presentes no melão bruto seja relativamente baixo, protocolos mais efetivos, como a associação de modificação de pH com adsorção em carvão ativado (ANTUNES et al., 2017a; KESHAV et al., 2016) poderiam promover maior remoção.

Interessante notar que o processo de hidrólise promoveu aumento do conteúdo de fenólicos totais no melaço (0,90 g 100 g⁻¹), o que comumente ocorre quando misturas ricas em açúcar são submetidas a condições de elevada temperatura e pressão. Embora o processo de hidrólise tenha contribuído para aumento destes conteúdos, o hidrolisado não foi submetido a nova clarificação buscando evitar perdas de açúcar e elevação de custos.

Compostos fenólicos são um grupo de compostos aromáticos bem conhecidos por serem inibidores do metabolismo microbiano, especialmente de leveduras e bactérias, ocasionando perdas de rendimento e produtividade (ADEBOYE et al., 2015). Entretanto, grande número de fungos filamentosos, especialmente os degradadores de madeira, apresentam atividade fenolítica, os quais demonstram não só tolerância a estes compostos, como a capacidade de degradá-los (ZHAO et al., 2018; MARTINEZ, 2017). De fato, a presença de compostos fenólicos totais no melaço hidrolisado parece não ter exercido atividade inibitória sobre o fungo *L. theobromae* MMPI.

A clarificação do melaço de soja também contribuiu para uma pequena redução no conteúdo de açúcares totais (11,4%), possivelmente devido a arraste destes junto ao precipitado formado (Figura 5 C).

O processo de clarificação mostrou influência sobre a composição dos açúcares presentes no melaço, especialmente sobre os conteúdos de sacarose e estaquiose. Reduções de 13% e 27% foram observadas nos conteúdos de sacarose e estaquiose, respectivamente, quando comparando o melaço bruto e clarificado.

Os resultados descritos na Tabela 2 evidenciam que a hidrólise do melaço de soja promoveu sua sacarificação. Reduções de 73% e 40% nos conteúdos de sacarose e estaquiose, respectivamente, foram observadas. Por outro lado, aumentos de 112% em frutose, 113% em galactose e 54% em rafinose foram evidenciados.

A redução do conteúdo de estaquiose (galactose + rafinose, Figura 1 F) pode ser justificada como uma consequência da quebra inicial desse oligossacarídeo em galactose e rafinose (galactose + glicose + frutose, Figura 1 E) (LEBLANC et al., 2004). A redução da concentração de sacarose (73%) no melaço hidrolisado em relação ao não hidrolisado (melaço clarificado) foi acompanhada por um aumento no conteúdo de frutose (112%), mas não foi detectado aumento significativo em glicose. Possivelmente, parte da glicose pode ter sido degradada em hidroximetilfurfural, que

é um produto comumente produzido a partir de hexoses submetidas a condições de pressões e temperaturas elevadas (SILVA et al., 2003)

5.2 PRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA

5.2.1 Efeito da suplementação do meio de cultivo a base de melaço de soja bruto e clarificado na biossíntese de lasiodiplodana

Conforme pode ser verificado na Tabela 3, a suplementação do melaço de soja com sais minerais e fonte de nitrogênio não contribuíram pronunciadamente para um melhor desempenho do processo em relação a biossíntese de lasiodiplodana. A suplementação do meio contribuiu de forma mais intensa para o crescimento celular.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos da produção de lasiodiplodana, em melaço de soja sem e com suplementação após 72h

| Parâmetros Fermentativos | Meio sem suplementação | Meio com suplementação |
|--|------------------------|------------------------|
| Açúcar total residual (g L ⁻¹) | 1,55 | 1,26 |
| P _F (g L ⁻¹) | 8,41 | 10,60 |
| P _x (g L ⁻¹) | 4,60 | 8,40 |
| Y _{P/S} (g g ⁻¹) | 0,92 | 0,83 |
| Y _{X/S} (g g ⁻¹) | 0,51 | 0,66 |
| Y _c (%) | 85,4 | 91 |
| Q _P (g L.h ⁻¹) | 0,12 | 0,15 |
| Q _X (g L.h ⁻¹) | 0,06 | 0,12 |
| Q _S (g L.h ⁻¹) | 0,13 | 0,18 |

Fonte: Autoria própria.

P_F: produção de lasiodiplodana, P_x: produção de biomassa, Y_{P/S}: rendimento em lasiodiplodana, Y_{X/S}: rendimento em biomassa, Y_e: rendimento específico, Y_c: percentual de consumo de açúcares totais, Q_P: produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q_X: produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S: taxa global de substrato consumido.

Após as 72 h de cultivo, foi verificada produção de lasiodiplodana de 8,41 g L⁻¹ e 10,6 g L⁻¹ nos meios sem e com suplementação, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos relatados (8,88 g L⁻¹) por Slivinski (2014) ao avaliar a produção de lasiodiplodana em meio com melado de cana de açúcar sem suplementação nutricional.

Em ambas as condições avaliadas no presente estudo, elevado consumo de açúcares foi verificado, sendo encontrados percentuais de consumo (Y_c) de 92,25% (sem suplementação) e 93,7% (com suplementação).

A elevada assimilação do substrato indica que o melado de soja pode ser um atrativo meio fermentativo para o cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI, o qual foi hábil em utilizar os nutrientes presentes no melado de soja para produção de biomassa celular e para a biossíntese de lasiodiplodana.

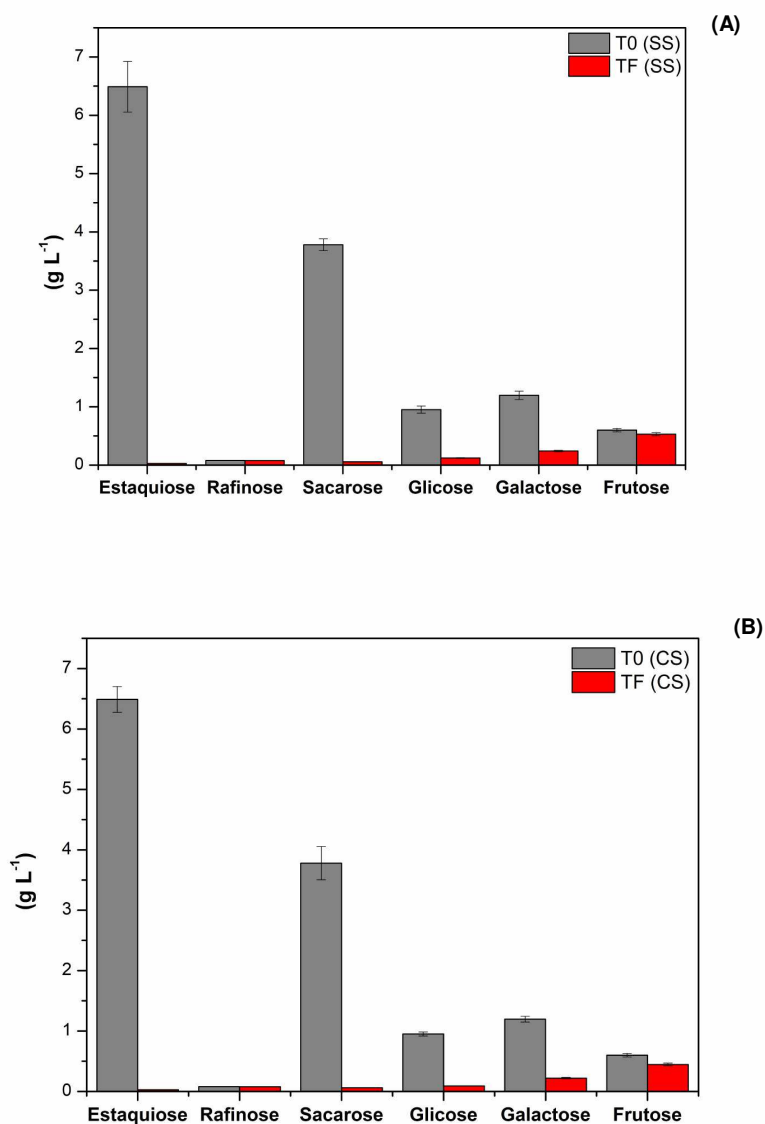
Embora a produção final de lasiodiplodana em meio suplementado foi 26% superior quando comparada a produção em meio sem suplementação, maior rendimento em lasiodiplodana (0,92 g g⁻¹) foi observado em meio sem suplementação. Tais resultados sugerem que a suplementação nutricional do meio melado de soja, não é um fator essencialmente necessário para a biossíntese eficiente de lasiodiplodana pelo *L. theobromae* MMPI.

Considerando a similaridade dos resultados obtidos em ambos os ensaios (sem e com suplementação) e os custos agregados ao processo fermentativo, a condução dos ensaios de bioprodução de lasiodiplodana em meio melado de soja, poderia ser mais atrativa economicamente se realizada sem suplementação nutricional.

A Figura 8 mostra o consumo global de cada um dos açúcares identificados no melado de soja, antes (T0) e após (TF) o processo fermentativo, nos ensaios conduzidos com (CS) e sem suplementação nutricional (SS). Todos os açúcares presentes no melado de soja foram efetivamente assimilados pelo *L. theobromae*, sendo verificado consumo completo da estaquiase e superior a 90% dos açúcares rafinose, glicose e sacarose em ambos os meios (com e sem suplementação) após 72h de fermentação. Apenas a frutose apresentou um conteúdo residual sutilmente superior aos demais açúcares.

Similarmente, Siqueira (2007) reportou que a suplementação do meio a base de melado de soja não promoveu melhores rendimentos no processo de produção de etanol.

Figura 8 - Conteúdos de açúcares no meio de melaço de soja sem suplementação (A) e com suplementação (B)

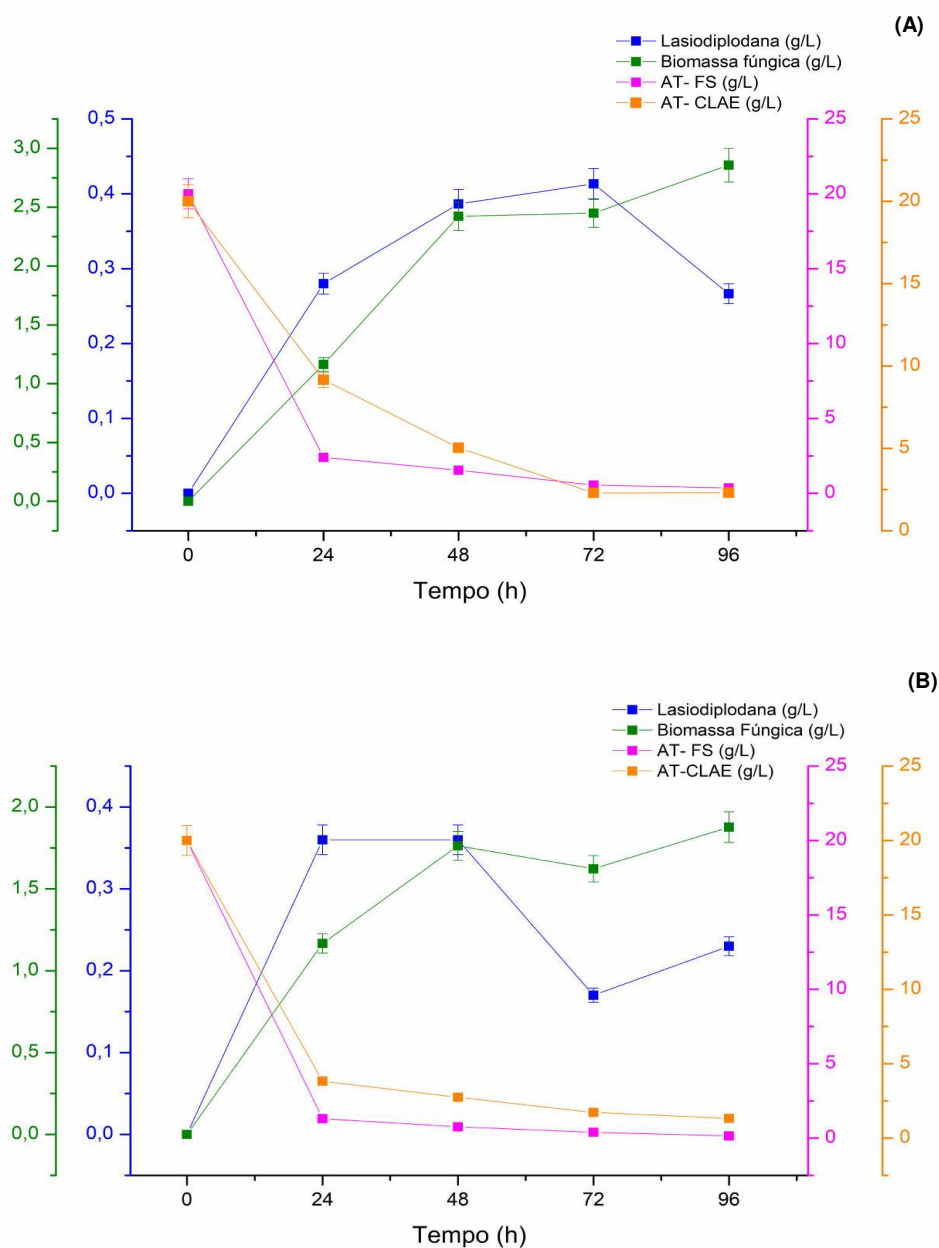


Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Produção de lasiodiplodana em melaço hidrolisado e não hidrolisado

A Figura 9 mostra o perfil cinético das fermentações do melaço de soja sem suplementação, antes (Figura 9 A) e após hidrólise química (Figura 9 B).

Figura 9 – Perfil da fermentação do melão de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) em meio não suplementado



Fonte: Autoria própria.

O fungo *L. theobromae* MMPI mostrou elevado potencial de assimilação tanto no meio submetido a hidrólise ($Y_c=99,25\%$, 96 h), quanto no meio não hidrolisado ($Y_c=98,25\%$, 96 h) com consumo quase completo do substrato. Tal comportamento sugere que não é necessário a sacarificação do melão de soja previamente a fermentação para produção de lasiodiplodana e crescimento micelial. A efetiva assimilação dos oligossacarídeos verificados na Figura 9 A e na Tabela 5 (melão não hidrolisado) indica que o fungo estudado produz as enzimas α -galactosidase (α -

D-galactosídeo galactohidrolase) e invertase (β -frutofuranosidase) e portanto não sendo necessário a hidrólise de tais oligossacarídeos.

Máxima produção de lasiodiplodana ($0,41 \text{ g L}^{-1}$) foi observada após 72 h nos cultivos com melaço não hidrolisado. A hidrólise do melaço não contribuiu para maior produção do exopolissacarídeo ($P_F=0,36 \text{ g L}^{-1}$ em 24 h e 48 h), e nem para um maior crescimento micelial. Maior conteúdo de biomassa foi verificado em 96 h ($2,86 \text{ g L}^{-1}$) em meio não hidrolisado quando comparado ao meio hidrolisado ($1,88 \text{ g L}^{-1}$).

Conforme pode ser verificado na Figura 9 A, em 72 h de cultivo os açúcares presentes no melaço não hidrolisado já haviam sido quase completamente assimilados. Neste momento, observa-se uma redução de 34% na concentração de lasiodiplodana disponível no meio em relação a 48 h de cultivo. A diminuição do conteúdo de lasiodiplodana pode ser justificada por possível produção de 1-6- β -glucanase, como já relatado por Cunha et al. (2012) e Kagimura et al. (2015a). A 1-6- β -glucanase atua sobre as ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow6)$, liberando o monômero glicose para o meio, o qual poderia ser utilizado como substrato assimilável. De fato entre 48 h e 72 h é verificado uma estagnação no crescimento micelial, possivelmente devido a carência de substrato no meio, no entanto, entre 72 h e 96 h, paralelamente a redução na concentração de lasiodiplodana é verificada uma retomada de crescimento micelial.

Na Figura 9 B verifica-se uma melhor assimilação do substrato melaço de soja hidrolisado, comparado ao melaço não hidrolisado. Neste sentido, em 48 h de cultivo 96,2% dos açúcares já haviam sido assimilados e ocorrendo na sequência (entre 48 h e 72 h) queda tanto no conteúdo micelial (8%) como no conteúdo de lasiodiplodana (53%). Similarmente como verificado no meio não hidrolisado, após hidrólise da β -glucana no meio de cultivo (entre 48 h e 72 h) ocorreu uma retomada de crescimento micelial e síntese do exopolissacarídeo (entre 72 h e 96 h).

Tabela 4 - Parâmetros fermentativos da fermentação do melaço de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) em meio não suplementado

| Parâmetros fermentativos | Melaço de soja | | | | Melaço de soja hidrolisado | | | |
|--|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | A | | | | B | | | |
| Tempo (h) | 24 | 48 | 72 | 96 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| Açúcar total residual (g L ⁻¹) | 2,40 ^a | 1,54 ^{bc} | 0,55 ^d | 0,35 ^{de} | 1,31 ^b | 0,76 ^{cd} | 0,40 ^{de} | 0,15 ^e |
| P _F (g L ⁻¹) | 0,28 ^a | 0,39 ^a | 0,41 ^a | 0,27 ^a | 0,36 ^a | 0,36 ^a | 0,17 ^a | 0,23 ^a |
| P _X (g L ⁻¹) | 1,16 ^c | 2,42 ^{ab} | 2,45 ^{ab} | 2,86 ^a | 1,17 ^c | 1,76 ^{cb} | 1,62 ^{bc} | 1,88 ^{abc} |
| Y _{P/S} (g g ⁻¹) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| Y _{X/S} (g g ⁻¹) | 0,07 | 0,13 | 0,13 | 0,15 | 0,06 | 0,09 | 0,08 | 0,09 |
| Y _C (%) | 88 | 92,3 | 97,25 | 98,25 | 93,45 | 96,2 | 98 | 99,25 |
| Q _P (g L.h ⁻¹) | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 |
| Q _X (g L.h ⁻¹) | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,02 | 0,02 |
| Q _S (g L.h ⁻¹) | 0,73 | 0,38 | 0,27 | 0,20 | 0,78 | 0,40 | 0,27 | 0,21 |

P_F: produção de lasiodiplodana, P_X: produção de biomassa, Y_{P/S}: rendimento em lasiodiplodana, Y_{X/S}: rendimento em biomassa, Y_C: percentual de consumo de açúcares totais, Q_P: produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q_X: produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S: taxa global de substrato consumido.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

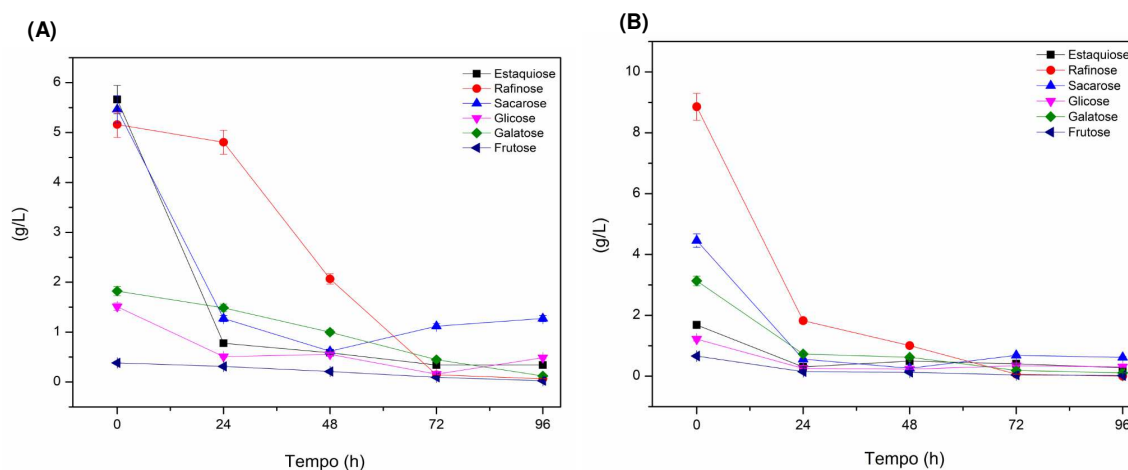
Valores similares de rendimento em lasiodiplodana (Y_{P/S}) são observados ao longo do cultivo em ambos os meios. Da mesma forma, são observados valores similares de produtividades volumétricas em lasiodiplodana (Q_P) e biomassa micelial (Q_X), bem como de taxa global de consumo de substrato (Q_S). Já com relação ao rendimento em biomassa micelial o melaço não hidrolisado demonstrou ser mais efetivo.

Na Figura 10 A está descrito o perfil de consumo individual de cada açúcar. Intensa assimilação foi verificada nas primeiras 24 h em melaço de soja não hidrolisado, onde foram observados percentuais de consumo de 86% de estaquiose, 6,9% de rafinose, 77% de sacarose, 66% de glicose, 18% de galactose e 18% de frutose. Em 72 h de processo, já havia sido consumido quase todos os açúcares presentes no meio de cultivo, restando apenas 20% de sacarose.

Perfil similar de assimilação dos respectivos açúcares do melaço foi verificado na fermentação com meio hidrolisado (Figura 10 B).

Em ambos os meios pode ser observado que as concentrações de rafinose são superiores aos demais açúcares até 48 h. Isto poderia ser justificado, pelo fato da rafinose (galactose + glicose + frutose) ser originada da hidrólise parcial da estaquiose (galactose + galactose + glicose + frutose).

Figura 10 – Consumo dos açúcares pelo fungo *L. theobromae* MMPI utilizando melaço de soja não hidrolisado (A) e hidrolisado (B) durante a fermentação



Fonte: Autoria própria.

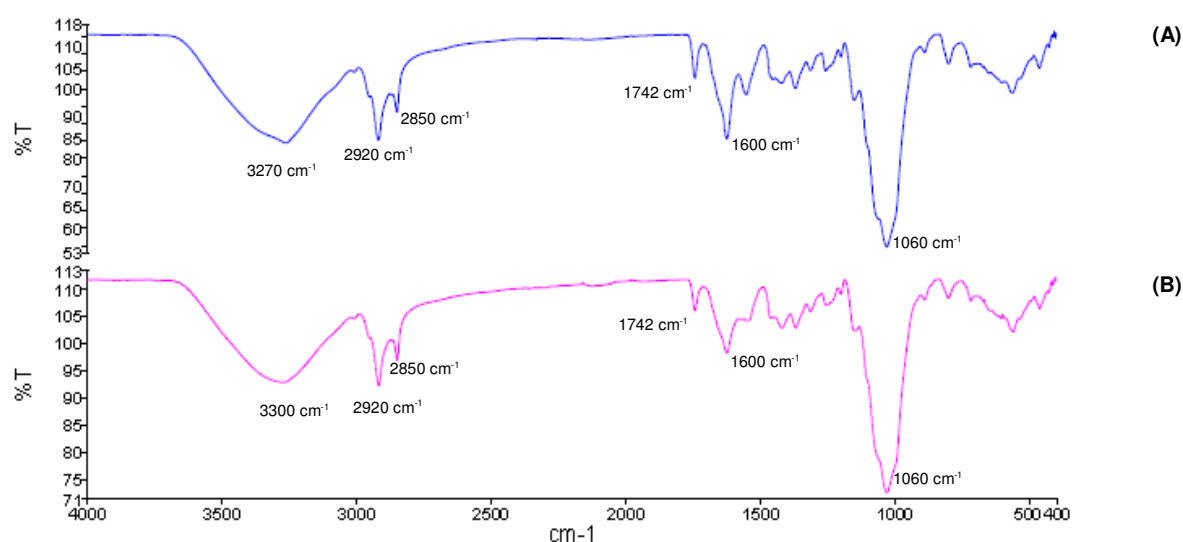
Cunha et al. (2012) em cultivos com o *L. theobromae* MMPI com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, sacarose) observaram melhores resultados de produção de lasiodiplodana em glicose e maltose (2,05 e 2,08 g L⁻¹, respectivamente). Frutose e sacarose, em contraste, resultaram em menores quantidades de lasiodiplodana (1,55 e 1,36 g L⁻¹, respectivamente), em 48 h de fermentação.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA

5.3.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF)

As amostras de lasiodiplodana obtidas nos meios a base de melado de soja não hidrolisado (LAS) e hidrolisado (LAS-H) foram avaliadas pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, e os espectros obtidos estão descritos na Figura 11.

Figura 11 – Espectro de infravermelho (IV-TF) da LAS (A) e LAS-H (B)



Fonte: Autoria própria

Os espectros de infravermelho obtidos das amostras LAS e LAS-H (12 A e B) foram similares e ambas as amostras apresentaram sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 e 400 cm^{-1} .

As bandas de forte intensidade nas regiões 3270 cm^{-1} (LAS) e 3300 cm^{-1} (LAS-H), são atribuídas a vibração de estiramento -OH, e verificadas comumente em amostras de carboidratos (CALEGARI et al. 2017, SANCHES-LUNA et al., 2018).

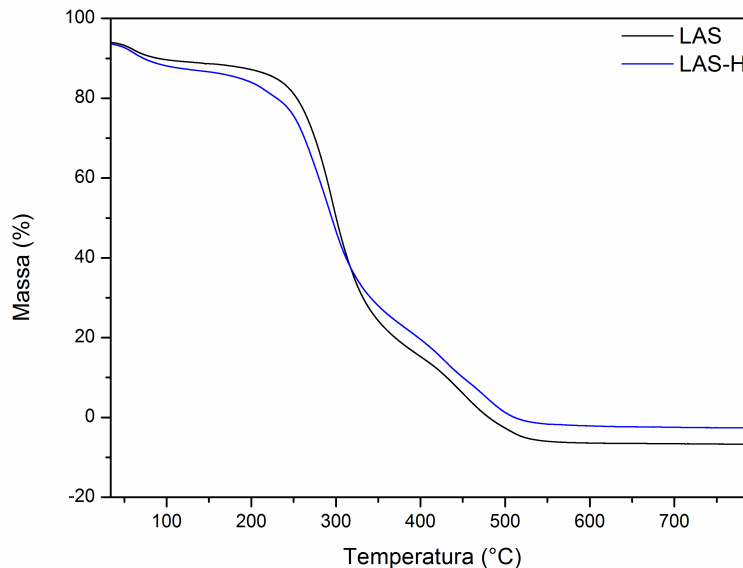
As bandas verificadas nas regiões de 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , em ambos os espectros, foram atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente do grupo metileno -CH (MAZUREK et al., 2013; MALINOWSKA et al., 2018), e a banda em 1742 cm^{-1} está relacionada a grupo metil protonado (DAMMAK et al., 2018). A banda em 1600 cm^{-1} é referente a vibração do anel de glicose (XU et al.,

2009, KAGIMURA et al., 2015b), e pode ser associada também a vibração de flexão do grupo hidroxila de água associada (TAZIKHEH et al. 2014, HE et al., 2014). Vibrações de alongamento simétrico C-O-C (grupo característico de açúcares) foram verificadas em 1060 cm^{-1} (WANG; ZHANG 2009).

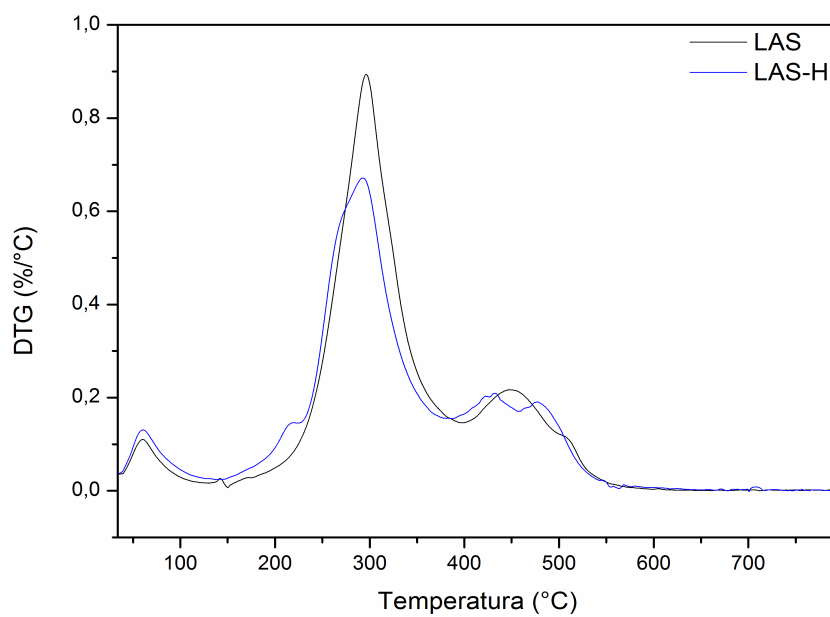
5.3.3 Análise Térmica

As curvas de termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e termogravimetria diferencial (DTA) das amostras de lasiodiplodana produzidas nos meios com melaço de soja não hidrolisado (LAS) e hidrolisado (LAS-H) estão descritas nas Figuras 12, 13, 14, respectivamente:

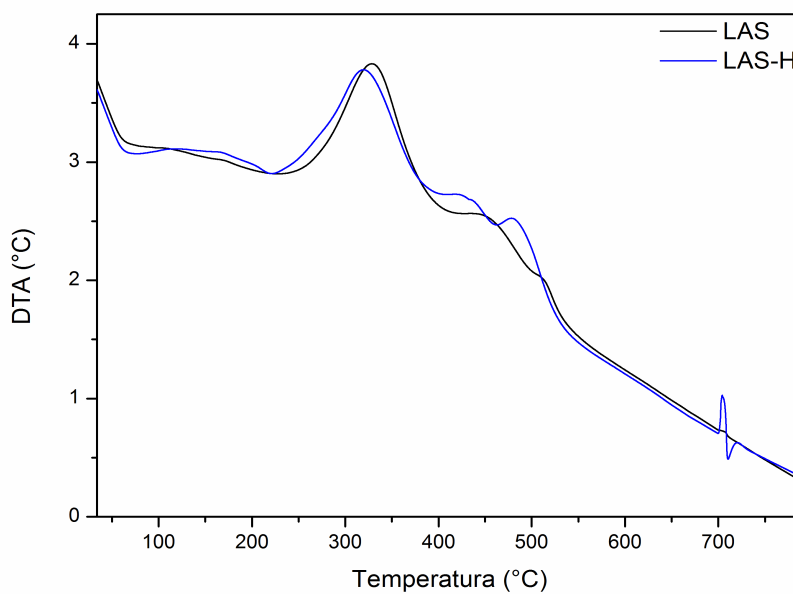
Figura 12 – Curvas de TG das amostras LAS e LAS-H



Fonte: Autoria própria.

Figura 13 – Curvas DTG das amostras LAS e LAS-H

Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Curvas DTA das amostras LAS e LAS-H

Fonte: Autoria própria.

Os dados de análise térmica, indicam a ocorrência de 3 estágios de perda de massa similares entre as amostras LAS e LAS-H. O primeiro evento ocorreu até 150 °C e é atribuído à eliminação de água da amostra, o qual foi confirmado em 60 °C pela curva DTG e por um pico endotérmico nas curvas de DTA. Em seguida, ocorreram dois eventos consecutivos com expressiva perda de massa entre 250 °C e 525 °C, e indicada por um pico exotérmico em 340 °C nas curvas de DTA, correspondendo à degradação térmica do exopolissacarídeo. A decomposição final, caracterizada pela carbonização das amostras, foi evidenciada pela DTA por picos exotérmicos em 465 °C e 525 °C na amostra LAS e em 425 °C e 500 °C na LAS-H. Este leve deslocamento para a esquerda verificado nos picos da DTA foi a única diferença observada entre as amostras LAS e LAS-H (Figura 14).

Como pode ser observado na Tabela 5, no primeiro evento relacionado à perda de água, houve redução de 11,34% na massa de LAS e 13,38% na amostra LAS-H. Entre 150 °C e 200 °C as duas amostras permaneceram com massa estável (TG) sofrendo em seguida, redução até 525 °C (TG) de 94% (LAS) e 90% (LAS-H). Ao final do processo de análise térmica (800 °C), houve 100% de perda de massa em ambas as amostras LAS e LAS –H.

Tabela 5 - Conteúdo de perda de massa das amostras de LAS e LAS-H em intervalos de temperatura determinados

| Intervalo de temperatura (°C) | Perda de massa (%) TG | |
|-------------------------------|-----------------------|-------|
| | LAS | LAS-H |
| 35 - 150 | 11,34 | 13,38 |
| 200 - 350 | 24,22 | 27,93 |
| 350 - 525 | 93,97 | 89,96 |
| 525 - 800 | 100 | 100 |

Fonte: A autoria própria.

Com base nos resultados descritos nas Figuras 12, 13 e 14 e na Tabela 5 pode ser evidenciado que as amostras LAS e LAS-H exibiram temperaturas de decomposição inicial análogas (próximas a 250 °C) e comportamento térmico similar, caracterizado por estabilidade térmica relativamente elevada, o que torna a

lasiodiplodana obtida a partir de melão de soja promissora para aplicações em diferentes processos tecnológicos.

Tais resultados foram similares aos já descritos por Theis et al. (2017) cujos autores evidenciaram três etapas de perda de massa por análise termogravimétrica de lasiodiplodana obtida utilizando glicose como fonte de carbono em meio mínimo de sais de Vogel, onde o evento inicial de perda de água ocorreu em 100 °C, seguido da decomposição do polissacarídeo em 230 °C e carbonização em 425 °C.

Desta mesma forma, Sanches-Luna et al. (2018) também verificaram três estágios de perda de massa, sendo o primeiro acima de 127 °C (perda de água), confirmado por um pico endotérmico em 63 °C, seguido por evento entre 200 e 400 °C, confirmado por dois picos exotérmicos de perda de massa em 310 °C e 475 °C (DTA).

5.3.4 Análise da solubilidade em água

A solubilidade em água é uma característica importante para biomoléculas com potencialidades biotecnológicas, visto que tanto em aplicações biológicas e tecnológicas, a água é o principal veículo e agente solubilizante (SECHI, 2017). Por isso, foi determinada a solubilidade em água a 25 °C das amostras de lasiodiplodana, obtidas nos meios melão de soja bruto (LAS) e hidrolisado (LAS-H), cujos resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de solubilidade da LAS e LAS-H em água a 25 °C

| Amostra | Solubilidade (%) |
|----------------|---------------------------|
| LAS | 3,21 ± 0,015 ^a |
| LAS-H | 2,81 ± 0,005 ^a |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autoria própria.

As amostras LAS e LAS-H apresentaram percentual de solubilidade em água de 3,21% e 2,81%, respectivamente, e não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Tais resultados foram similares aos reportados por Somensi (2014) e Calegari et al. (2017), em amostras de lasiodiplodana produzidas em meio a base de glicose, os quais verificaram hidrossolubilidade de 3% e 2,8%, respectivamente.

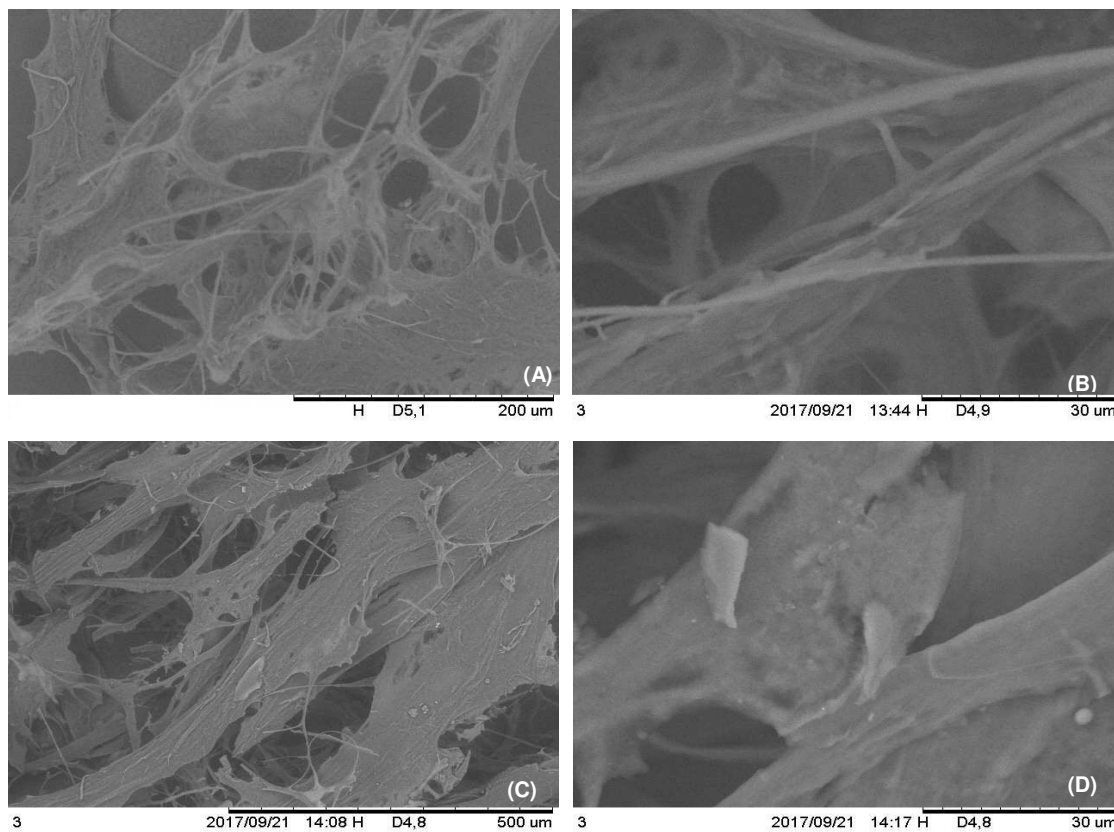
A baixa solubilidade da lasiodiplodana é justificada pela conformação que a macromolécula apresenta após desidratação. Embora esta macromolécula apresente grande número de hidroxilas, as quais poderiam interagir com a água, tais grupamentos constroem interações intramoleculares dificultando a solvatação do polímero pela água.

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A literatura científica destaca que o meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio e sais minerais) afeta a composição monomérica, organização estrutural e morfologia do biomaterial obtido. Neste sentido, amostras de lasiodiplodana obtidas em meio de cultivo melaço de soja bruto (LAS) e melaço de soja hidrolisado (LAS-H) foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 15.

De acordo com as micrografias apresentadas, é possível observar que os biopolímeros LAS e LAS-H apresentam morfologia similar, caracterizada por aspecto de filmes finos contendo grande número de filamentos, dispostos de maneira heterogênea e sobreposta em toda a extensão do material (Figura 15). Morfologia similar foi verificada para amostras de lasiodiplodana obtidas em meio mínimo de sais de Vogel contendo glicose como fonte de carbono, em estudo realizado por Somensi (2014), Sanches-Luna et al. (2018) e Calegari et al. (2017). Estes autores também verificaram a presença de dobras ao longo da extensão do biopolímero, o que não foi evidenciado no presente estudo.

Figura 15 - Micrografias da LAS e LAS-H obtidas por MEV. (A) LAS em aumento de 200 X, (B) LAS em aumento de 2000 X, (C) LAS-H em aumento de 200 X, (D) LAS-H em aumento de 2000 X.



Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÕES

O melaço de soja apresentou composição química rica em carboidratos, em especial glicose, sacarose, rafinose e estaquiose, e menores proporções de frutose e galactose. Os elevados teores de carboidratos tornam esta biomassa atrativa como substrato em diferentes bioprocessos.

Consideráveis conteúdos de fenólicos totais foram encontrados no melaço de soja bruto e o processo de hidrólise contribuiu para o aumento destes. O processo de clarificação do melaço não contribuiu de forma efetiva para a remoção de compostos fenólicos.

A hidrólise química do melaço de soja usando ácido sulfúrico como catalisador promoveu a hidrólise parcial dos oligossacarídeos presentes, em especial da estaquiose e da sacarose.

O melaço de soja demonstrou ser um substrato promissor para o crescimento micelial e produção de lasiodiplodana pelo ascomiceto *L. theobromae* MMPI, não havendo necessidade de suplementação nutricional do meio.

Embora a hidrólise química do melaço tenha contribuído para uma melhor assimilação inicial dos açúcares presentes no melaço, não há necessidade de hidrólise do melaço para a produção de lasiodiplodana pelo fungo estudado.

As amostras de lasiodiplodana produzida em melaço não hidrolisado e hidrolisado apresentaram espectros de infravermelho (IV-TF) típicos de glucanas, similares entre si e a espectros descritos na literatura para lasiodiplodana produzida em meio a base de glicose.

Elevada estabilidade térmica também foi verificada nas amostras, sendo verificado três estágios de perda de massa, o primeiro evento em 150 °C, seguido de dois eventos entre 250 °C e 525 °C.

A microscopia eletrônica de varredura revelou uma superfície não uniforme, contendo estruturas que lembram filmes finos com muitos filamentos, dispostos de forma heterogênea e sobrepostos ao longo de toda a superfície do material.

As amostras apresentaram baixa solubilidade em água (após liofilização), como é característico de glucanas com estrutura linear.

REFERÊNCIAS

X

- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express*, v. 4, 2014.
- ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; BRUMANO, L. P.; TERAN HILARES, R.; PERES, G. F. D.; SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. *RENEWABLE ENERGY*, v. 1, p. 1-10, 2017a.
- ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; DOS SANTOS, J. C.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G. F. D.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production in fluidized bed reactor from sugar cane bagasse hydrolysate: interplay among carrier concentration and aeration rate. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*; v. 5, n. 9, p. 8250-8259, 2017b.
- ANWAR Z., GULFRAZ M., IRSHAD M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. v. 7, i. 2, p. 163–173, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC Internation. 20 ed., Gaithersburg, Maryland, USA, 2016.
- BARBOSA, I. M. V.; MORAIS JÚNIOR., W.G.; CARDOSO, V. L. Otimização do tempo na produção de lipase por *Candida rugosa* em melão de soja. São Paulo: Blucher. ISSN 2359-1757, p. 645-650, 2014.
- BLANDÓN, L. M.; NOSEDA, M. D.; ISLAN, G. A.; CASTRO, G. R.; PEREIRA, GILBERTO, V. M. P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. Optimization of culture conditions for kefir production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. v. 16, p. 14-21, 2018.
- BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M. Sustainable polymer production. *Polym.-Plant. Technol*. v. 43, p.1779-1793, 2004.
- CALEGARI, G. C.; SANTOS, V. A. Q.; TEIXEIRA, S. D.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA M. A. A. Sulfonation of (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan) and its antioxidant and antimicrobial potential. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, v. 5, p. 850-863, 2017.
- CANUTO, A. P. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CARDONA, C.A., QUINTERO, J.A., PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 101, i. 13, p. 4754–4766, 2010.
- CEDERROTH, C.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 304, p. 30-42, 2009.
- CHAJUSS, D. Soy molasses: processing and utilization as a functional food: In: LIU, K. (Ed.). Soybeans as a functional foods and ingredients. Missouri: AOCS, p.132-144, 2004.
- CHIMILOVSKI, J. S.; HABU, S.; TEIXEIRA, R. F. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NOSEDA, M. D.; MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Antitumour activity of *Grifola frondosa* exopolysaccharides produced by submerged fermentation using sugar cane and soy molasses as carbon sources. *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, n.3, p. 359-363, 2011.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Soja – Brasil. 2018, Acomp. safra bras. grãos, v. 6 Safra 2018/19 - Segundo levantamento, Brasília, Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> >. Acesso em: 08 nov. 2018.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of

Botryosphaeria rhodina MAMB-05. Carbohydrate Research, v. 343, p. 793–798, 2008.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, E. 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, p. 1179-1188, 2012.

CUNHA, M. A. A.; ALBORNOZ, S. L.; SANTOS, V. A. Q.; SÁNCHEZ, W. N.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H. Structure and biological functions of d-glucans and their applications. Stud. Nat. Prod. Chem. 53, 2017.

DA SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U. C.; RIBEIRO, E. J. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. Biochemical Engineering Journal, v. 69, p. 61-68, 2012.

DAMMAK, M. I.; CHAKROUN, I.; MZOUGH, Z.; AMAMOU, A.; MANSOUR, H. B.; LECERF, D.; MAJDOUB, H. Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. Biomas, v. 119, p. 198-206, 2018.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. Process Biochemistry, v. 39, p. 411-414, 2003.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 951-962, 2012.

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356, 1956.

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R. F. H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 125-130, 2015.

GONÇALVES, L. C.; DE ANDRADE, A. P. C.; RIBEIRO, G. P.; SEIBEL, N. F. Composição química e propriedades tecnológicas de duas cultivares de soja. Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 3, i.1, p. 33-40, 2014.

GUEDES, A. R.; CORAZZA, M. L.; ZANOELO, E. F. Boiling point, specific heat and density measurements and modeling of soybean molasses and its aqueous solutions. Journal of Food Process Engineering, v. 39, i.3, p. 283-295, 2015.

GUPTA, R.; GAUTAM, S.; SHUKLA, R.; KUHAD, R. C. Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 5, p. 4573-4582, 2017.

GURGEL, L. V. A. Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HE, Y.; YE, M.; DU, Z.; WANG, H.; WU, Y.; YANG, L. Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. Carbohydrate Polymers, v. 105, p. 169-176, 2014.

IMCOPA. Apresenta texto sobre Soja. Disponível em <<http://www.imcopa.com.br/index.php>> Acesso em: 07 out. 2016.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, Bioresource Technology, V. 199, P. 103-112, 2016

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Production of the exopolysaccharide Lasiodiplodan in a stirred-tank bioreactor. Synergismus scientifica, v. 10, p. 1-8, 2015a.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; Malfatti, C. R. M.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; TEIXEIRA, S. D.; SALOMÉ, K. Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. Carbohydrate Polymers, v.

127, p. 390–399, 2015b.

KESHAV, P. K.; SHAIK, N.; KOTI, S.; LINGA, V. R. Bioconversion of alkali delignified cotton stalk using two-stage dilute acid hydrolysis and fermentation of detoxified hydrolysate into ethanol. *Industrial Crops and Products*, v. 91, p. 323-331, 2016.

LeBLANC, J. G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; DE GIORI, G. S.; PIARD, J. G.; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, p. 432-440, 2004.

LETTI, L. A. J. Production of bioethanol by soybean molasses fermentation by *Zymomonas mobilis*. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biomass & Bioenergy*, v. 44, p. 80-86, 2012.

LOMAN, A. A.; JU, L.K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals, *Process Biochem*, v. 5, n. 8, p. 1046-1057, 2016.

MACHADO, R. P. Produção do etanol a partir do melaço de soja. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications, *Microbiol Insights*, v. 6, p. 1-16, 2013.

MALFATTI, C. R. M.; DOS SANTOS, F. S.; WOUK, J.; DA SILVA, L. A.; MICHEL, R. G.; SNAK, A. L.; CZERVINSKI, T.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Intracerebroventricular administration of the (1 \rightarrow 6)- β -glucan (lasiodiplodan) in male rats prevents penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, p. 1289-1294, 2017.

MALINOWSKA, E.; KLIMASZEWSKA, M.; STRĄCZEK, T.; SCHNEIDER, K.; KAPUSTA, C.; PODSADNI, P.; ŁAPIENIS, G.; DAWIDOWSKI, M.; KLEPS, J.; GÓRSKA, S.; PISKLAK, D. M.; TURŁO, J. A Selenized polysaccharides – Biosynthesis and structural analysis, *Carbohydrate Polymers*, V. 198, P. 407-417, 2018.

MANTOVANI, D. Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonas e carboidratos obtidos a partir do melaço de soja. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MARTÍNEZ, A. T.; CAMARERO, S.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, M.J. Biological lignin degradation, *Lignin Valorization: Emerging Approaches*, Royal Society of Chemistry. Ed. G.T. Beckham, Chapter 8, 2016.

MAZUREK, S.; MUCCILOLO, A.; HUMBEL, B. M.; NAWRATH, C. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis* petals. *The Plant Journal*, v. 74, p. 880-891, 2013.

MELLO, M. B.; MACHADO, C. S.; RIBEIRO, D. L.; AISSA, A. F.; BURIM, R. V.; CUNHA, M. A. A.; BARCELOS, G. R. M.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. *Toxicology (Amsterdam)*, v. 376, p. 66-74, 2017.

MORAIS JÚNIOR, W.G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation, *Protein Expression and Purification*, v. 123, p. 26-34, 2016.

MOREIRA, F. S.; MACHADO, R. G.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L. Avaliação da produção de hidrogênio usando melaço de soja como substrato por cultura pura, *Suplemento - Resumos Expandidos do IV Simpósio de Tecnologia Sucreenergética e de Biocombustíveis*, v.8, 2016.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger – Princípios de bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 975p,

2002.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P.; KNAUSS, C. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a whey-based medium. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 148-151, 1997.

PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, John; KRISTIANSEN, Bjorn. *Biocologia Básica*. Tradução: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acríbia, p. 449-462, 1991.

PENKUMSRI, N.; SIVAMARUTHI, B. S.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S.; KESIKA, P.; CHAIYASUT, K.; CHAIYASUT, C. Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, v. 37, p. 124-130, 2017.

PHILIPPINI, R. R. Produção de exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017

QUEIROZ, E. A. I. F.; FORTES, Z. B.; CUNHA, M. A. A.; SARILMISER, H. K.; BARBOSA, A. M.; ÖNER, E. T.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N. Levan promotes antiproliferative and pro-apoptotic effects in MCF-7 breast cancer cells mediated by oxidative stress. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 103, p. in press, 2017.

RODRIGUES, M.S., MOREIRA, F.S., CARDOSO, V.L., RESENDE, M. M. Soy molasses as a fermentation substrate for the production of biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 22, p.18699-18710, 2017.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M. ; CARDOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. *Energy & Fuels*, v. 26, p. 2310-2316, 2012.

SALMON, D. N. X.; FENDRICH, R. C.; CRUZ, M. A.; MONTIBELLER, V. W.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma sp.* MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation, *Biochemical Engineering Journal*, v. 114, p. 288-297, 2016.

SANCHES-LUNA, W. N. S.; SANTOS, V. A. S.; TEIXEIRA, S. D.; BARBOSA-DEKKER, A. M. ; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. O-Acetylated (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan (lasiodiplodan): chemical derivatization, characterization and antioxidant activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, p. 320-332, 2018.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo como *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n.4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, V. A. Q.; NASCIMENTO, C. G.; SCHIMIDT, C. A. P.; MANTOVANI, D.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. Solid-state fermentation of soybean okara : Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *Food Science and Technology*, v. 92, p. 509-515, 2018.

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

SECHI, N. S. M. Fosforilação da (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana (lasiodiplodana): caracterização físico-química e estrutural. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

SELITRENNIKOFF, C. P. *Antifungal Drugs: 1,3-Glucan Synthase Inhibitor*. 1^o ed. R G Landes Co, 1995.

SILVA, M, L, C; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SILVA, R. N., MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* v. 299, p. 152-178, 1999.
- SIQUEIRA, P. F. Production of bio-ethanol from soybean molasse by *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SIQUEIRA, P. F.; KARP, S.G.; CARVALHO, J.C. ; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; THOLOZAN, J. L.; 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, p.8156–8163, 2008.
- SLIVINSKI, J. Estudo da produção de biopolímero e biomassa pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio à base de melado de cana-de-açúcar empregando delineamento fatorial. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.
- SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J.A.; FOGLIA, T. A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*, *Biotechnology Letter*, v.29, p. 1341–1347, 2007.
- SOMENSI, F. Y. K. Bioprodução de β -(1→6)-D-Glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.
- 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.
- SUTHERLAND I. W. *Biotechnology of microbial polysaccharides*. UK: Cambridge University Press, 1990.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TAZIKEH, S.; AKBARI, A.; TALEBI, A.; TALEBI, E. Synthesis and characterization of tin oxide nanoparticles via the co-precipitation method. *Materials Science-Poland*, v. 32, i. 1, p. 98–101, 2014.
- 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 (1-6)- β -D-Glucan (Lasioidiplodan): Carboxymethylation, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. *American Journal of Immunology*, v. 13, i. 1, p. 19-33, 2017.
- TURMINA, J. A.; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R. F.; BARBOSA, A. M.; SANTOS, F. S.; SILVA, L. A.; MALFATTI, C. R. Toxicological assessment of β -(1,6)-glucan (Lasioidiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage. *Molecules (Basel. Online)*, v. 17, n. 12, p. 14298-14309, 2012.
- VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R. da.; SILVA, M. L. C. Three exopolysaccharides of the β -(1→6)-D-glucan type and a β -(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. *Carbohydrate Research*, v. 343, n. 14, p. 2481-2485, 2008.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetic Bulletings*, v. 13, p. 42–43, 1954.
- WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 105-112, 2009.
- WANG, Y.; MO, Q.; LI, Z.; LAI, H.; LOU, J.; LIU, S.; MAO, J. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, p. 1052-1056, 2012.
- XIANG, Q. Conversion of lignocellulosic substrate into chemicals: kinetic study of dilute acid hydrolysis and lignin utilization. Tese (Doutorado) - Universidade de Auburn, Alabama. 2002.

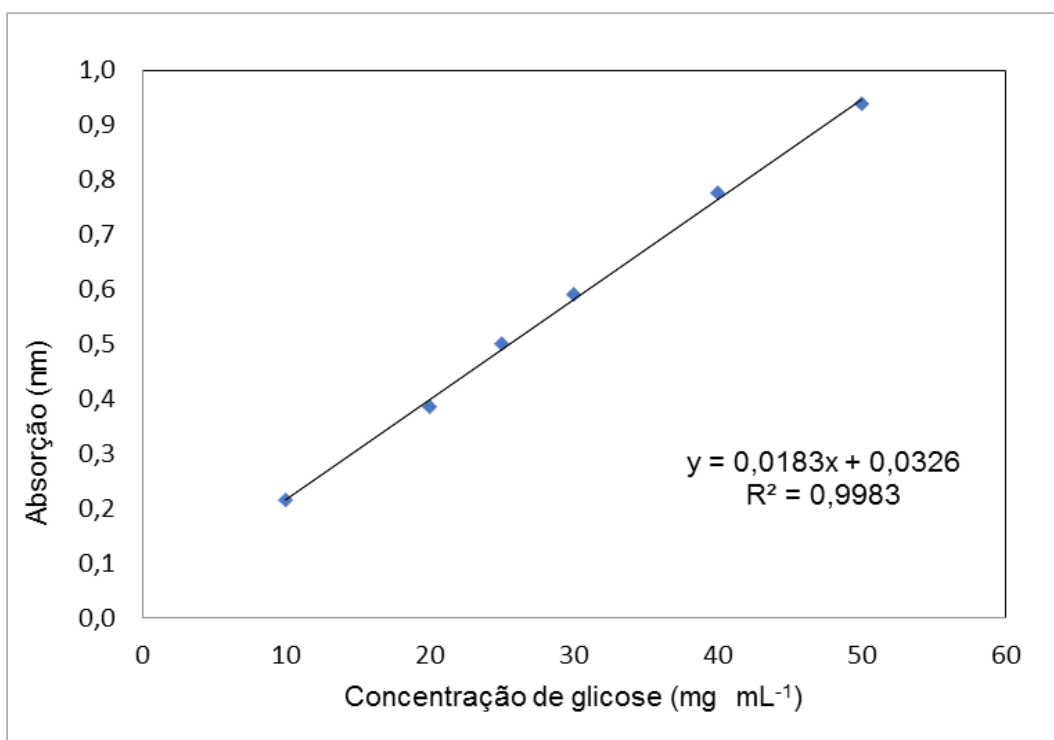
XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 227-234, 2009.

ZHAO, T.; KANDASAMY, D.; PAAL, K.; JINGYUAN, C.; GERSHENZON, J.; ALMUTH, H. Fungal associates of the tree-killing bark beetle, *Ips typographus*, vary in virulence, ability to degrade conifer phenolics and influence bark beetle tunneling behavior, *Fungal Ecology*, in press, 2018.

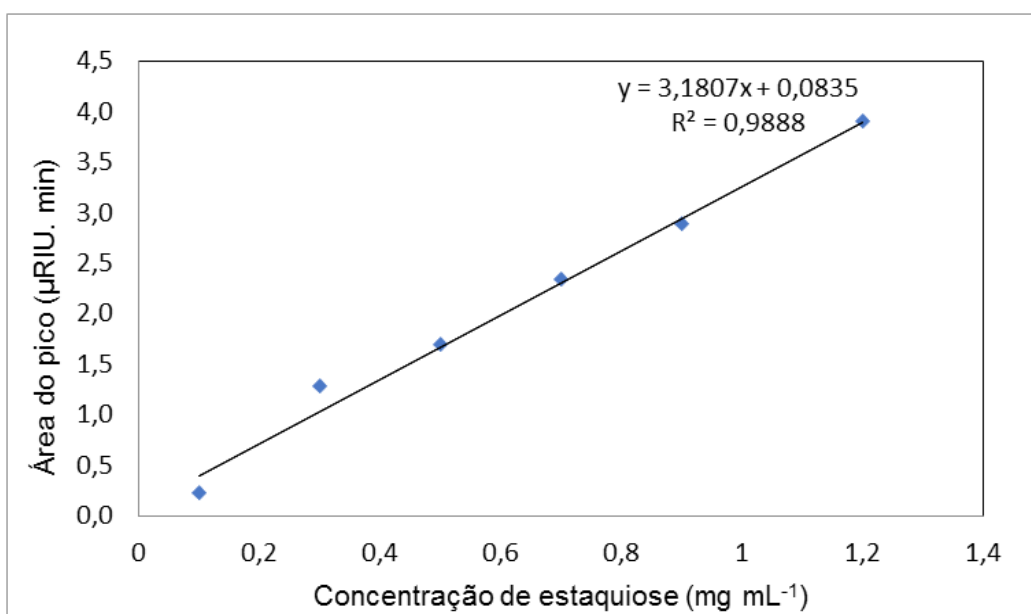
ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Chemical composition and functional properties of three soy processing by-products (soy hull, okara and molasses). *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, v. 7, n 5, p. 651-660, 2015.

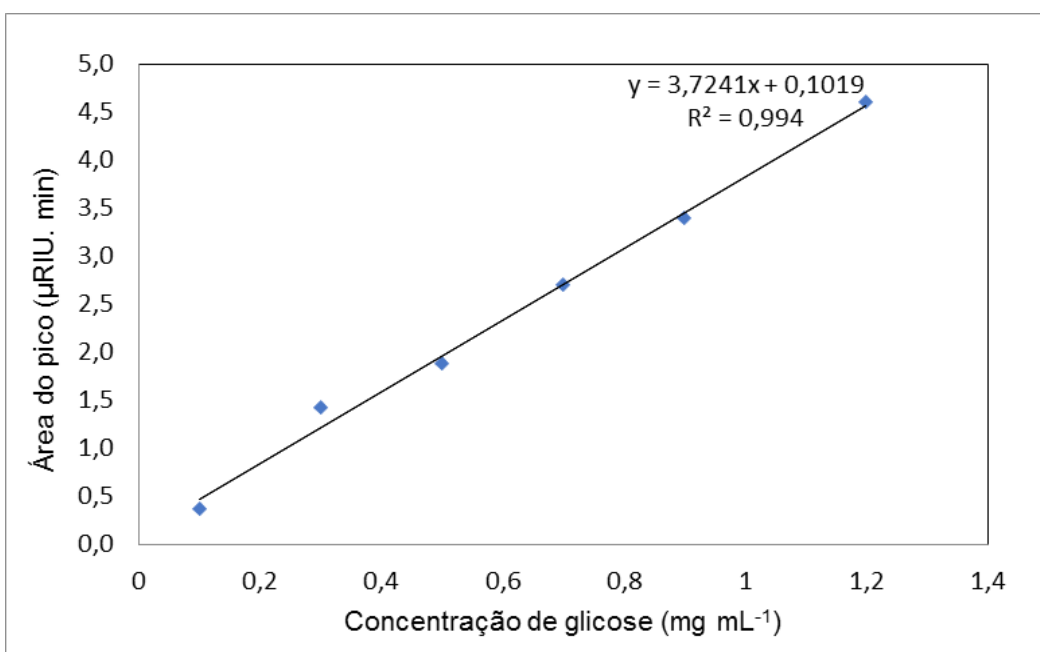
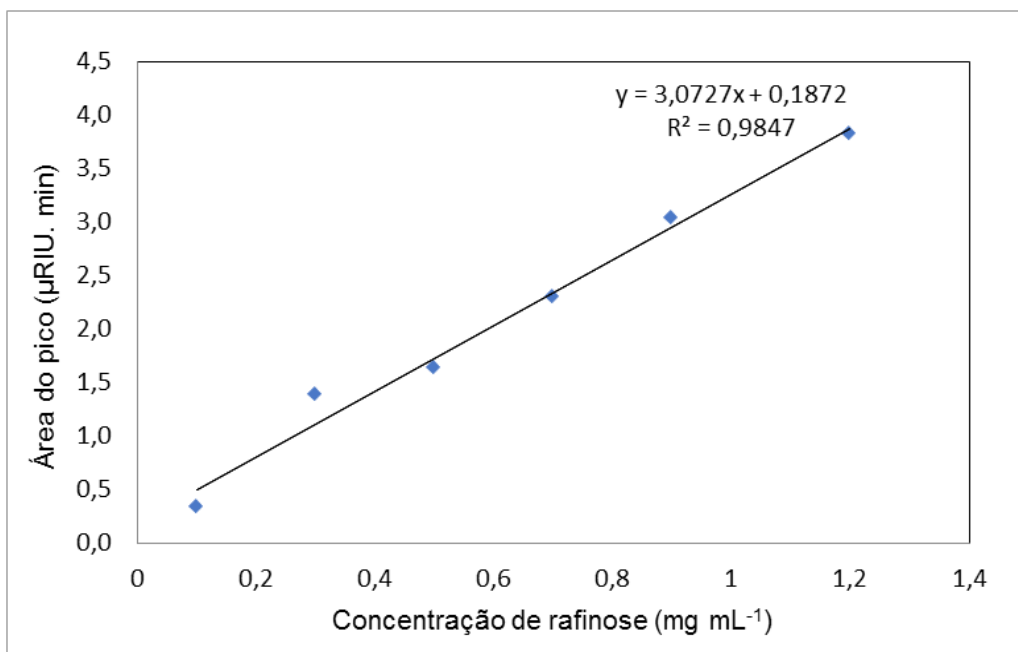
APÊNDICES

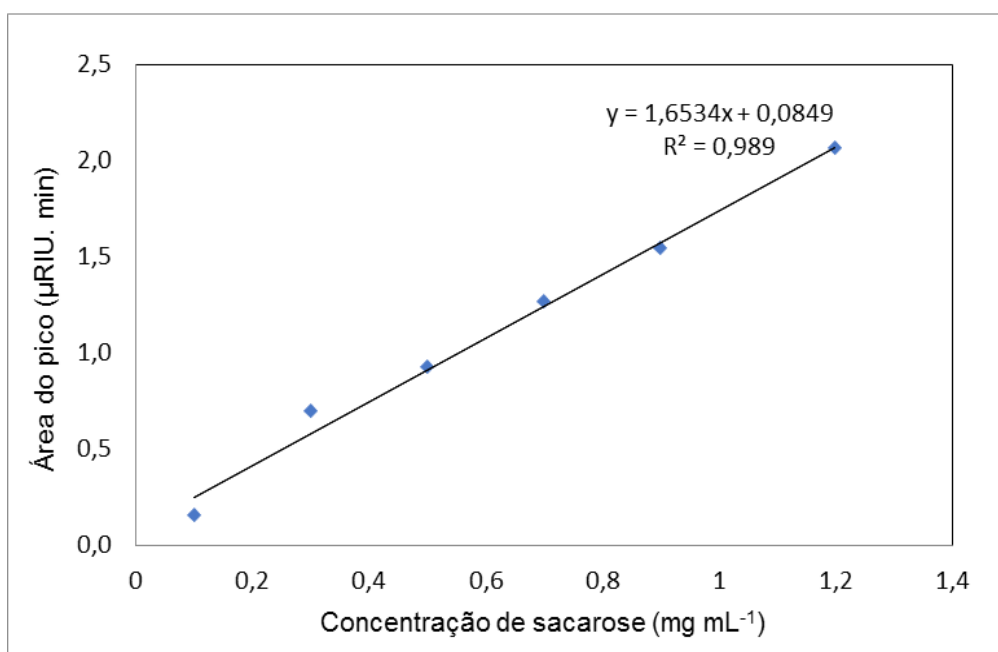
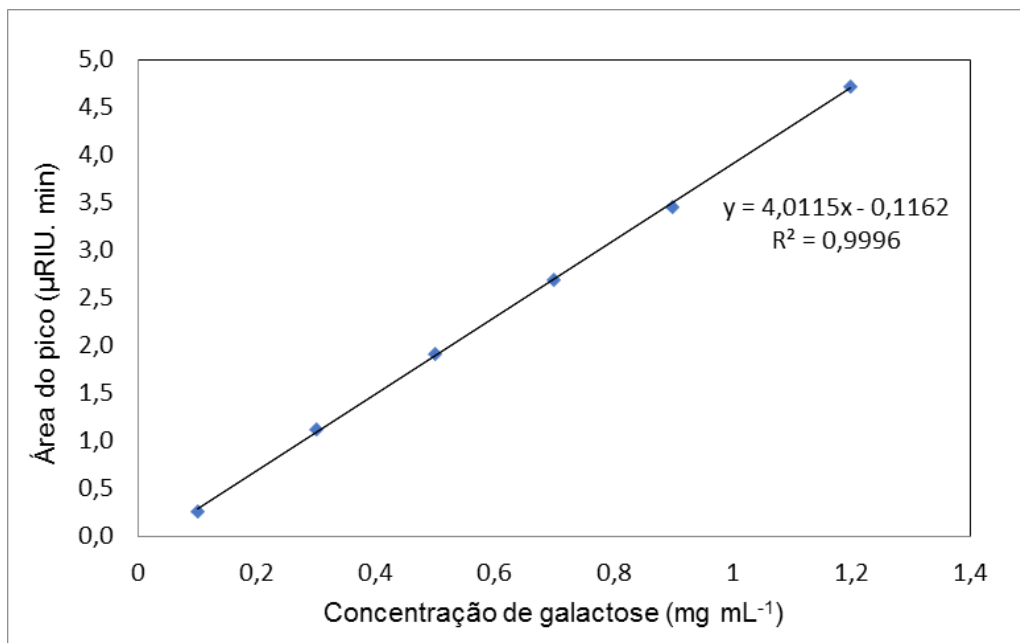
Apêndice A – Curva padrão de glicose, obtida por espectrofotometria

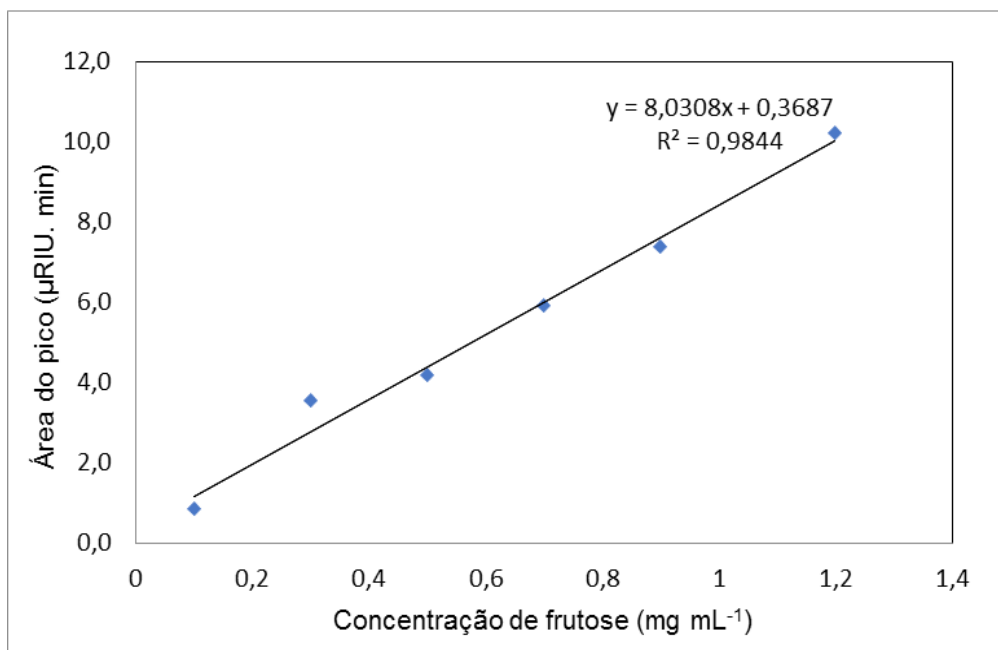


Apêndice B – Curva padrão de estaquiose, rafinose, glicose, sacarose, frutose e galactose, obtidas em CLAE









Apêndice C – Curva padrão de ácido gálico, obtida por espectrofotometria

