

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**LUANA MALAQUIAS BERTOLETI**

**MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE  
(1→6)- $\beta$ -D-GLUCANA (LASIODIPLODANA)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO  
2019**

Luana Malaquias Bertoleti

**MELAÇO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE  
(1→6)-β-D-GLUCANA (LASIODIPLODANA).**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Mário Antônio Alvez da Cunha.

Co-orientador: Marcelo Marchioro.

PATO BRANCO

2019

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

O trabalho de diplomação intitulado Melaço de soja como substrato para a produção de (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana) foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N°15.2.2019-B de 2019.

Fizeram parte da banca os professores.

Mário Antônio Alves da Cunha

Simone Beux

Mariana de Souza Sikora

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Angelica Malaquias e Antonio Luiz Bertoleti, por todo apoio e abdicções que fizeram para minha chegada até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Angelica Malaquias e Antonio Luiz Bertoleti por todo amor, paciência e abdição as quais foram fundamentais para esta conquista.

As minhas irmãs Mikeli Malaquias Bertoleti, Josieli Malaquias Bertoleti e Graziela Malaquias Bertoleti, por todo amor, carinho e apoio durante estes anos de faculdade.

Agradeço em especial minha amiga Larissa Leite Momolli que esteve ao meu lado desde o início desta caminhada, sempre me apoiando e me ajudando, compartilhando alegrias e frustrações, sua amizade foi de fundamental importância.

Ao meu professor orientador Doutor Mário Antônio Alvez da Cunha e ao meu coorientador Marcelo Marchioro, pelos ensinamentos, auxílio e paciência as quais foram de fundamentais importância para a o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação.

Por fim agradeço a Central de Análises pela realização de várias etapas deste trabalho.

## EPÍGRAFE

“Não importa quão rápido a luz viaje, a  
escuridão sempre chega primeiro.”  
Terry Pratchett

## RESUMO

BERTOLETI, Luana M. Melaço de soja como substrato para a produção de (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). 2019. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

Em escala comercial as glucanas tem sido obtidas por extração da parede celular de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e cereais como aveia e cevada. No entanto, os processos de extração comumente apresentam custos operacionais elevados. Uma alternativa para reduzir custos poderia ser a produção de glucanas extracelulares usando meios de cultivo de baixo custo. Neste contexto o presente trabalho propõe a produção de lasiodiplodana extracelular pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, cultivado em meio submerso formulado a base de melaço de soja. A influência de diferentes concentrações de açúcares sobre o desempenho do bioprocessamento foi estudada. Os produtos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), Análise Térmica (TG, DSC), Difração de raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Análise de IV-TF revelaram bandas típicas de polissacarídeos com configuração β-glicosídicas, micrografias de MEV revelaram amostras contendo área superficial com aspectos de filmes finos, translúcidos, contendo regiões com superfície lisa e com dobras ao longo de seu comprimento. A análise por difração de raios-x demonstrou que ambas as amostras apresentam estrutura tipicamente amorfa, mas contendo regiões com certa organização molecular. As análises térmicas demonstraram que as amostras de lasiodiplodana obtidas no meio à base de melaço de soja apresentam elevada estabilidade térmica, sendo observado três eventos de perda de massa. O melaço de soja demonstrou ser um bom substrato para o crescimento micelial e produção de lasiodiplodana pelo fungo estudado. Maiores concentrações de substrato promoveram melhor desempenho do bioprocessamento, incluindo a obtenção de melhores rendimentos e produtividades volumétricas em lasiodiplodana, bem como maior crescimento micelial.

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

## ABSTRACT

BERTOLETI, Luana M. Soybean molasses as a substrate for the production of (1→6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana). 2019. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

On a commercial scale, glucans have been obtained by extracting the cell wall from yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* and cereals such as oats and barley. However, extraction processes commonly have high operating costs, and an alternative to reducing costs could be the production of extracellular glucans using low cost cultivation media. In this context, the present work proposes the production of exocellular lasiodiplodan by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI in submerged cultivation using medium based soybean molasses. The influence of different sugar concentrations on bioprocess performance was studied. The biopolymers obtained were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Thermal Analysis (TG, DSC), X-ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM). FT-IR analysis revealed typical bands of  $\beta$ -glycosidic polysaccharides, SEM micrographs revealed samples containing surface area with thin and translucent film aspects, containing smooth surface regions and folds along their length. X-ray diffraction analysis showed that both samples have typically amorphous structure but contain regions with some molecular organization. Thermal analysis showed that lasiodiplodan samples obtained from soybean molasses presented high thermal stability, and three mass loss events were observed. Soybean molasses proved to be a good substrate for mycelial growth and lasiodiplodan production by the fungus studied. Higher substrate concentrations promoted better bioprocess performance, including improve the yields and volumetric productivity in lasiodiplodan and mycelial biomass growth.

**Keywords:**  $\beta$ -glucans. submerged fermentation. Exopolysaccharide. by-product of soybeans.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama resumido da geração do melaço de soja.	8
Figura 2 - Perfil da fermentação do melaço de soja com concentração de 20 g L <sup>-1</sup> .	19
Figura 3 - Perfil da fermentação do melaço de soja com concentração de 40 g L <sup>-1</sup> .	20
Figura 4 - Micrografias do exopolissacarídeo obtido em meio a base de melaço de soja.	21
Figura 5 - Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana obtida a partir de 20 gL <sup>-1</sup> (Lasio-20) e 40 gL <sup>-1</sup> (Lasio-40) de substrato.	22
Figura 6 - Difratogramas das amostras de lasiodiplodana produzidas.	23
Figura 7 - Termograma das amostras de lasiodiplodana (Las-20).	24
Figura 8 - Termograma das amostras de lasiodiplodana (Las-40).	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos das fermentações conduzidas com 20 g L <sup>-1</sup> de concentração inicial de açúcares totais.	17
Tabela 2 - Parâmetros fermentativos das fermentações conduzidas com 40 g L <sup>-1</sup> de concentração inicial de açúcares totais.	17

## LISTA DE ACRÔNIMOS

°C - Graus célsius;

DRX - Difração de raios-X;

DTA - Análise Térmica Diferencial;

DTG - Termogravimétrica derivada;

EPS - Exopolissacarídeo;

FT-IR - Espectroscopia no infravermelho;

$g\ g^{-1}$  - Grama produto formado por grama de substrato consumido;

$g\ L^{-1}$  - Gramas por litro;

$g\ L.h^{-1}$  - Grama por litro de produto formado por hora;

h - Horas;

*L. theobromae* - *Lasiodiplodia theobromae* MMPI;

Las-20 – amostra de lasiodiplodana produzidas a partir de substrato com concentração de melação de soja de  $20\ g\ L^{-1}$ ;

Las-40 – Amostra de lasiodiplodana produzidas a partir de substrato com concentração inicial de açúcares totais de  $40\ g\ L^{-1}$ ;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

MMV - Meio mínimo de Vogel;

PF - Produção de lasiodiplodana;

pH - Potencial de hidrogênio;

PTS - Proteína texturizada de soja;

$Q_P$  - Produtividade volumétrica em lasiodiplodana;

$Q_S$  - Taxa global de substrato consumido;

$Q_X$  - Produtividade volumétrica em biomassa celular;

$Y_C$  - Percentual de consumo de substrato;

$Y_e$  - Rendimento específico;

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

$Y_{P/X}$  - Rendimento específico;

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
2.1 GERAL	6
2.2 ESPECÍFICOS	6
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>7</b>
3.1 SOJA	7
3.1.1 Melaço de Soja	7
3.1.2 Exopolissacarídeos Microbianos	9
3.2 $\beta$ -GLUCANAS	10
3.2.1 Substratos Para a Produção de $\beta$ -Glucanas	11
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
4.1 MATÉRIA-PRIMA E MICRORGANISMO	12
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	12
4.2.1 Clarificação do Melaço Bruto	12
4.2.2 Preparo do Inóculo	12
4.2.3 Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana	13
4.2.4 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	15
4.2.5 Análise por Difração de Raios-X	15
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	16
4.2.7 Análise térmica	16
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>17</b>
5.1 Avaliação dos parâmetros fermentativos da produção do exopolissacarídeo	17
5.2 Caracterização da lasiodiplodana por Microscopia Eletrônica de Varredura	20
5.3 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	22
5.4 Caracterização por Difração de Raios-X	23
5.5 Caracterização por Análise térmica	23
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa de fácil adaptação agrícola, alta produtividade e elevado valor nutricional, sendo uma das principais commodities agrícolas produzidas e exportada pelo Brasil. O grão de soja apresenta em sua constituição elevados conteúdos de proteínas de alto valor biológico, além de ser rico em lipídeos e carboidratos, o que confere ao alimento alto valor energético.

Os principais produtos derivados da industrialização da soja são o óleo, proteína texturizada de soja (PTS) e farelo de soja. No processo de extração da proteína da soja é gerado um coproduto de coloração marrom escuro denominado melão de soja, rico em carboidratos como glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, sendo este ainda pouco explorado como substrato para a produção de produtos de elevado valor agregado. É verificado na literatura científica alguns trabalhos que descrevem o uso deste melão na produção de etanol, goma xantana, fosfolípidios, poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos e proteína celular.

As  $\beta$ -Glucanas são polissacarídeos de origem biológica, os quais tem despertado interesse de diversos setores da indústria em função de suas propriedades tecnológicas e funcionalidades biológicas. Dentre as funcionalidades biológicas mencionadas na literatura científica destacam-se as atividades imunomoduladora, anticoagulante, anticarcinogênica, antiviral e antioxidante (SOMENSI, 2014).

Em escala comercial as glucanas tem sido obtidas a partir da extração da parede celular de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e cereais como aveia e cevada. No entanto, os processos de extração de polissacarídeos de parede celular, comumente apresentam custos operacionais elevados, vistos que envolvem etapas como extração com água quente, álcalis e solventes orgânicos. Por outro lado, alguns microrganismos têm a capacidade de produzir extracelularmente  $\beta$ -glucanas quando cultivados em sistemas submersos, sendo tais macromoléculas mais facilmente recuperadas e isoladas.

Os exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares excretados para o meio, produzidos por fungos e bactérias, e têm sido reconhecidos como biomacromoléculas de elevado valor agregado (SOMENSI, 2014, p.16).

Na busca por microrganismos que realizem a produção citada, tem-se o ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, o qual embora seja um fitopatógeno de

muitas frutas tropicais, tem a capacidade de produzir uma glucana extra celular denominada lasiodiplodana. A lasiodiplodana é uma (1→6)-β-D-glucana que apresenta algumas propriedades biológicas e tecnológicas Cunha et al. (2019), e sua produção a partir de subprodutos, resíduos ou coprodutos agroindustriais pode ser uma ferramenta estratégica sob o aspecto econômico.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de lasiodiplodana pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em fermentações submersas conduzidas em modo descontínuo usando meio de cultivo a base de melação de soja.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o melaço de soja como substrato para a produção de lasiodiplodana em sistema submerso pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de substrato (açúcares totais) na produção de lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae*;
- Determinar os parâmetros fermentativos do bioprocesso: produção final de lasiodiplodana ( $P_F$ ), rendimento em biomassa celular ( $Y_{X/S}$ ) e em lasiodiplodana ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica em lasiodiplodana ( $Q_P$ ) e biomassa micelial ( $Q_X$ ), rendimento específico (produto formado por unidade de célula) ( $Y_{P/X}$ ) e percentual de consumo de substrato ( $Y_c$ ), e consumo global de substrato ( $Q_s$ ).
- Caracterizar o exopolissacarídeo (lasiodiplodana) produzido em meio a base de melaço de soja, pelas técnicas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análises termogravimétricas (DTA, TGA, DTG).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SOJA

A soja é uma planta leguminosa pertencente à família Fabaceae e denominada cientificamente de *Glycine Max* (L. Merrill) (ROEPCKE, 2007). Tem origem na Ásia Oriental e as primeiras sementes chegaram ao Brasil trazidas por imigrantes chineses e japoneses no século XIX (FERNANDES; MIGUEL, 2012).

Devido à alta capacidade de adaptação, alta produtividade e qualidade nutricional, a soja é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo, sendo amplamente consumido na forma de óleo e seus derivados como margarina e gordura hidrogenada (RAMÃO, 2011). O Brasil é o maior exportador mundial de soja, com uma exportação aproximada de 68,1 toneladas entre 2017 e 2018, e o segundo maior produtor mundial de soja, com uma produção estimada de 116,996 milhões de toneladas no mesmo período. Mato Grosso é estado com a maior produção brasileira do grão, produzindo aproximadamente 31,887 milhões de toneladas na safra 2017/2018 (EMBRAPA, 2018).

A soja possui alto valor nutricional, o qual está associado a grandes quantidades de proteínas, óleos de fácil digestão e sua composição pode variar com as condições climáticas e variedade genética da planta (ROEPCKE, 2007).

O grão em base seca é constituído por aproximadamente 40% de proteínas, 35% de carboidratos, 20% de gorduras e 5% de resíduo mineral (ROEPCKE, 2007). A porção carboidrática da soja é constituída por amido, celulose e derivados, sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose, melibiose, galactose, ramnose e maltopentose. O açúcar presente em maior concentração na porção carboidrática do grão de soja é a sacarose ( $\cong$  50% dos carboidratos), o restante é constituído basicamente por rafinose e estaquiose (FERNANDES; MIGUEL, 2012).

##### 3.1.1 Melaço de Soja

O melaço de soja é um coproduto gerado no processo de produção de concentrado proteico de soja (SIQUEIRA et al., 2008). Após a etapa de extração do óleo dos grãos previamente triturados, os flocos desengordurados (flocos brancos, também chamado de farelo de soja) são lavados com solução etanólica (70-90% v/v)

para remoção de carboidratos polissacarídicos e proteínas (SARROUH et al., 2014). O material sólido lavado tem em torno de 65% (base seca) de proteínas e é chamado de concentrado proteico de soja (LONG; GIBBONS, 2013). O conteúdo de açúcar presente na soja é extraído pela solução hidroalcoólica e após a recuperação do etanol é obtido um melão com teor de umidade de cerca de 50% (SARROUH et al., 2014). Abaixo está descrito um fluxograma do processo (Figura 1):

Figura 1 - Diagrama resumido da geração do melão de soja.



Fonte: Autoria Própria (2019).

A composição do melão de soja é representando por 57,3% de carboidratos (massa seca), incluindo principalmente sacarose (28,4%), estaquiose (18,6%) e rafinose (9,68%). O melão também contém quantidades significativas de proteínas (9,44%) e lipídios (21,2%) (SIQUEIRA et al, 2008).

O melão de soja é gerado em grandes quantidades, o que pode levar a problemas ambientais quando descartado indevidamente no ambiente (SILVA, 2010), assim, grande parte dele tem sido utilizado como enriquecimento nutricional de baixo custo na alimentação animal (ROEPCKE, 2007).

Como o mesmo é um produto derivado da soja, possui rafinose (trissacarídeos) e estaquiose (tetrassacarídeos), que são açúcares de baixo valor nutricional para os

animais e nulo para os humanos. O baixo valor nutricional de tais açúcares está associado à incapacidade de sintetizar as  $\alpha$ -galactosidases, enzimas que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 presentes nos oligossacarídeos rafinose e estaquiose. As  $\alpha$ -galactosidases são indicadas para aplicação em processos biocatalíticos, tendo como objetivo a melhoria do valor nutricional de produtos de soja destinados à nutrição humana e animal, promovendo aumento na digestibilidade (SILVA, 2010).

Entretanto, é importante destacar que é possível utilizar o melaço de soja como matéria-prima para a produção de produtos de valor agregado. A utilização deste na produção de etanol foi avaliada nos trabalhos de Romão (2011), Machado (1999), Siqueira et al. (2008), Siqueira (2007) e Letti et al. (2012).

O melaço também demonstrou ser atrativo para a produção de goma xantana no estudo de Canuto (2006) e sua utilização na produção de poli-p-hidroxicanoatos foi avaliado nos estudos de Full, Jung e Madigan (2006). Outro emprego descrito na literatura científica é como substrato para a produção microbológica de fosfolipídios, descrito por Solaiman et al. (2007).

### 3.1.2 Exopolissacarídeos Microbianos

Na natureza existem microrganismos capazes de secretar para o meio políssacarídeos, os quais são denominados de exopolissacarídeos, e se subdividem em dois grupos, os homopolissacarídeos e os heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos constituídos por um único tipo de monossacarídeo, e os heteropolissacarídeos compostos de três a sete unidades monossacarídicas diferentes (ARANDA-SELVERIO et al., 2010).

Os exopolissacarídeos microbianos possuem elevada massa molecular, constituem reservas de carbono e energia, além de contribuírem para a resistência e proteção contra condições desfavoráveis do meio (YILDIZ, 2018).

Ao serem adicionados em alimentos se comportam como agentes espessantes, emulsificantes e gelificantes, sendo amplamente utilizados na indústria alimentícia (PATIL e SHIRSATH, 2015; MEYBODI e MOHAMMADIFAR, 2015).

Estudos demonstram que alguns polissacarídeos atuam sobre o sistema imunológico e outros apresentam atividades anticoagulante, antitrombótica, antioxidante e anti-inflamatória. Muitos polissacarídeos também têm demonstrado

atividades anticarcinogênica, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, antimicrobiana e também auxiliando na redução de riscos cardiovasculares (KAGIMURA et al., 2015).

### 3.2 $\beta$ -GLUCANAS

As  $\beta$ -glucanas são carboidratos integrantes das paredes celulares de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas, líquens e cereais como aveia e cevada (RAHAR et al., 2011). São constituídas por estruturas altamente ordenadas compostas por cadeias constituídas por unidades de D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas com configuração  $\beta$ -anomérica (KAGIMURA et al., 2015).

Nas últimas décadas este biopolímero vem recebendo maior atenção dos setores químico, farmacêutico e alimentício em função de suas propriedades tecnológicas e biológicas. As diferentes bioatividades das  $\beta$ -glucanas estão relacionadas a massa molecular, aos tipos de ligação glicosídicas entre as unidades monoméricas, solubilidade, conformação espacial e ao grau de polimerização da macromolécula (MAGNANIL; CASTRO-GÓMES, 2008).

Uma das propriedades biológicas de grande destaque é a sua capacidade imunomoduladora. O corpo humano não é capaz de sintetizar nem digerir no trato gástrico intestinal as  $\beta$ -glucanas, por isso não são reconhecidas pelo sistema imunológico como moléculas nata, sendo, portanto, indutoras tanto da resposta imunológica inata como adaptativa (KAGIMURA et al., 2015).

Outra propriedade que chama atenção é o fato de tais macromoléculas atuarem como fibras alimentares, portanto protegendo as paredes intestinais e atuando como prebiótico (CUNHA et al., 2017).

Alguns trabalhos mencionam a atividade antioxidante das  $\beta$ -glucanas. Giese et al., (2015) avaliaram a atividade antioxidante da botriosferana ((1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana), da curdlana e da laminarina ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucana) e similarmente observaram moderada atividade antioxidante.

A capacidade anticoagulante tem sido encontrada e descrita em algumas  $\beta$ -glucanas com a estrutura primária modificada quimicamente. Vasconcelos et al., (2008) verificaram que a derivatização química por sulfonação da lasiodiplodana produzida pelo *L. theobromae* MMLR promoveu atividade anticoagulante.

Outras propriedades biológicas das  $\beta$ -glucanas incluem atividade antiviral (STÜBLER E BUCHENAUER, 1996; JUNG et al., 2004), hipocolesterolêmica

(TÚRMINA et al., (2012) e ação protetora contra danos ao DNA induzido por drogas anticarcinogênicas como a doxorubicina (BIANCHI et al., 2017).

Theis et al., (2017) reportaram que a lasiodiplodana, produzida extracelularmente pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI tem moderada atividade antioxidante em sua forma nativa e que a carboximetilação da macromolécula potencializa essa bioatividade. Atividade antiproliferativa tem sido encontrada em algumas  $\beta$ -glucanas, incluindo a lasiodiplodana. Cunha et al., (2012) reportou a inibição da proliferação de células de câncer de mama MCF-7. Chen et al., (2005) verificou atividade antitumoral em polissacarídeo isolados do *Agaricus blazei*.

### 3.2.1 Substratos Para a Produção de $\beta$ -Glucanas

Na produção microbiológica das  $\beta$ -glucanas têm sido utilizados como substratos basicamente açúcares simples como glicose, frutose e sacarose (KAGIMURA., 2015).

São limitadas as informações referentes ao uso de substratos alternativos de baixo custo para a produção de  $\beta$ -glucanas. Pode ser mencionado o trabalho de Gomes et al. (2016), os quais extraíram  $\beta$ -glucana da parede celular de *Saccharomyces fragilis* cultivada em sistema submerso em meio a base de soro de leite. Por outro lado, não foram verificados até o momento na literatura científica trabalhos reportando o uso de substratos alternativos para produção microbiana extracelular de  $\beta$ -glucanas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA E MICRORGANISMO

O melaço de soja utilizado no preparo dos meios de cultivo foi cordialmente fornecido pela empresa CJ Selecta de Araguari, Minas Gerais, e armazenado em recipientes de polietileno de 1L em freezer horizontal (Electrolux, modelo 310) a -18 °C. Uma mesma amostra de melaço de soja foi utilizado durante a realização de todos os experimentos para evitar possíveis variações na composição do substrato.

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

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

### 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 4.2.1 Clarificação do Melaço Bruto

Para remoção de impurezas e melhor aproveitamento, o melaço de soja bruto foi diluído em água até obtenção de solução com teor de sólidos solúveis totais de 15 °Brix e tratado com solução ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e hidróxido de sódio (NaOH). Inicialmente o pH do melaço diluído foi ajustado para 3,0 com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, e então, submetido a agitação durante 24 horas sob refrigeração (4 °C). Posteriormente centrifugado (1500 x g, 30 min) e o pH ajustado para 5,5 com solução de NaOH 6 mol L<sup>-1</sup>, sendo novamente centrifugado, e então sendo obtido o melaço de soja clarificado como sobrenadante.

#### 4.2.2 Preparo do Inóculo

O micélio fúngico foi repicado em placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, as quais foram incubadas em estufa bacteriológica por 96 horas à 28 °C. O conteúdo micelial fúngico crescido foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel - MMV (VOGEL, 1954) e glicose (5 g L<sup>-1</sup>), posteriormente incubados por 48

horas em agitador orbital (shaker) a 28 °C e 150 rpm. A massa micelial foi separada por centrifugação (1500 x g, 20 min), ressuspensa em solução salina 0,9 % (m v<sup>-1</sup>) e homogeneizada em liquidificador para obtenção de uma suspensão micelial com concentração padronizada por leitura espectrofotométrica em 400 nm (absorbância entre 0,4 e 0,5), conforme descrito por STELUTI (2004).

#### 4.2.3 Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL em incubadora orbital (shaker) a 28 °C, 150 rpm por 96 horas. O meio de cultivo consistiu de melação de soja clarificada com concentrações de açúcares totais de 20 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup>, e pH inicial de 5,5. O volume de inóculo padronizado foi de 10 mL e o volume de meio de 90 mL conforme descrito por Cunha et. al. (2012).

O crescimento celular e a produção do exopolissacarídeo foram monitorados ao longo da fermentação, sendo coletadas amostras a cada 24 horas de cultivos.

##### 4.2.3.1 Determinação dos parâmetros fermentativos

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

Estabelecida pela relação entre a quantidade de lasiodiplodana produzida (P) e a correspondente variação do substrato ( $\Delta S$ ) (fonte de carbono).

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

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

Estabelecida pela relação entre a quantidade de biomassa produzida (X) e a correspondente variação do substrato ( $\Delta S$ ) (fonte de carbono).

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

c) Produtividade volumétrica em lasiodiplodana ( $Q_P$ )

Estabelecida pela razão entre a quantidade de lasiodiplodana produzida ( $P_f - P_i$ ) e o intervalo do tempo correspondente ( $\Delta t$ ).

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

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 ( $\Delta t$ ):

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

e) Percentual de consumo de substrato ( $Y\%$ )

O percentual de consumo de substrato foi obtido através da relação entre o conteúdo de substrato consumido ao longo da fermentação ( $S_i - S_f$ ) e o conteúdo inicial do mesmo ( $S_i$ ).

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

f) Taxa global de consumo de substrato ( $Q_s$ )

A taxa de consumo de substrato foi calculada a partir da razão do consumo de substrato pelo tempo ( $\Delta t$ ):

$$Q_s = \frac{\text{consumo sustrato}}{\text{tempo de fermentação}}$$

g) Rendimento específico ( $Y_e$ )

O rendimento específico é calculado a partir da razão entre a produção de lasiodiplodana pela produção de biomassa celular.

$$Y_e = \frac{\text{lasiodiplodana}}{\text{biomassa celular}}$$

Separou-se a biomassa do caldo fermentado após a fermentação por meio de centrifugação (1500 x g 30min.). A biomassa fúngica intensamente lavada com água destilada a 80°C até completa remoção do exopolissacarídeo e seca a 50°C em estufa até massa constante.

Para a caracterização da lasiodiplodana obtida a partir da fermentação com melaço hidrolisado, a macromolécula separada do caldo por precipitação etanólica, ressuspensa em água a 60°C, submetida a intensa diálise contra água (6 dias com trocas diárias) e então liofilizada.

#### 4.2.3.2 Determinação de açúcares totais

Os conteúdos de açúcares totais das amostras foram determinados pelo do método Fenol-Sulfúrico (Dubois, 1956) utilizando curva padrão de glicose.

#### 4.2.3.3 Determinação do pH

O pH foi determinado em pHmetro de bancada modelo TEC-2 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba) por medição direta na amostra.

#### 4.2.3.4 Quantificação de biomassa micelial e de exopolissacarídeos

A biomassa celular após a separação do caldo fermentado foi lavada com água quente (60 °C) para a remoção do EPS, seca em estufa á 70 °C até massa constante e quantificada por gravimetria. O EPS presente no caldo fermentado foi precipitado com etanol 95% (à 5 °C overnight), sendo empregada a relação 1:3, entre caldo e etanol. O EPS precipitado foi seco até massa constante e quantificado por gravimetria.

#### 4.2.4 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho da lasiodiplodana foram gerados em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, USA) na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 acumulações e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , usando o método ATR.

#### 4.2.5 Análise por Difração de Raios-X

O perfil difratométrico das amostras foi obtido em difratômetro de raio X modelo XDR-6000 (Shimadzu, USA) com fonte de radiação de lâmpada de cobre ( $\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$ ), corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, ângulo de varredura de 10° a 60° (2 $\theta$ ), velocidade de 0,5°/min e passo de 0,02 graus, para definir os padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras.

#### 4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia superficial das amostras de lasiodiplodana foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura de bancada modelo TM3000 (Hitachi, USA). Foram obtidas micrografias com amplitudes de 60 X, 200 X, 800 X e 1500 X.

#### 4.2.7 Análise térmica

As amostras liofilizadas de lasiodiplodana 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<sup>-1</sup> e ar sintético com fluxo de 50 ml min<sup>-1</sup>, (KAGIMURA et. al. 2015).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos parâmetros fermentativos da produção do exopolissacarídeo

Os parâmetros fermentativos do processo foram determinados para avaliação do desempenho do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI quanto à produção de EPS e crescimento celular nos cultivos com meio a base de melaço de soja contendo diferentes concentrações de açúcares totais. Os respectivos resultados estão plotados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos das fermentações conduzidas com 20 g L<sup>-1</sup> de concentração inicial de açúcares totais.

Parâmetros fermentativos	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
P <sub>F</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,24	0,31	0,36	0,28
P <sub>X</sub> (g L <sup>-1</sup> )	1,187	2,27	2,46	3,02
Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	0,02	0,02	0,02	0,01
Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	0,08	0,14	0,14	0,16
Y <sub>C</sub> (%)	73,17	80,52	89,17	93,79
Y <sub>e</sub>	0,20	0,14	0,15	0,09
Q <sub>X</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	0,05	0,05	0,03	0,03
Q <sub>S</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	0,61	0,34	0,25	0,2
Q <sub>P</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	0,01	0,01	0,01	0,003
Açúcar total residual (g L <sup>-1</sup> )	5,37	3,9	2,17	1,24
pH	5,81	5,64	5,63	5,39

P<sub>F</sub>: produção de lasiodiplodana, P<sub>X</sub>: produção de biomassa micelial, Y<sub>P/S</sub>: conversão dos açúcares em lasiodiplodana, Y<sub>X/S</sub>: conversão dos açúcares em biomassa micelial, Y<sub>e</sub>: rendimento específico, Y<sub>c</sub> percentual de consumo de substrato, Q<sub>P</sub>: produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q<sub>X</sub>: produtividade volumétrica em biomassa celular, Q<sub>S</sub>: taxa global de substrato consumido.

Fonte: Autoria Própria (2019).

Tabela 2 - Parâmetros fermentativos das fermentações conduzidas com 40 g L<sup>-1</sup> de concentração inicial de açúcares totais.

Parâmetros fermentativos	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
P <sub>F</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,36	0,53	0,56	‘
P <sub>X</sub> (g L <sup>-1</sup> )	5,77	8,99	10,72	10,32
Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	0,01	0,02	0,02	0,02
Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	0,22	0,32	0,34	0,29
Y <sub>C</sub> (%)	64,49	70,46	79,85	88,85
Y <sub>e</sub>	0,06	0,06	0,05	0,08
Q <sub>X</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	0,24	0,19	0,15	0,11
Q <sub>S</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	1,07	0,59	0,44	0,37
Q <sub>P</sub> (g L.h <sup>-1</sup> )	0,02	0,01	0,01	0,01
Açúcar total residual (g L <sup>-1</sup> )	14,20	11,82	8,06	4,46
pH	5,43	5,46	5,39	5,45

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

Fonte: Autoria Própria (2019).

Como pode ser verificado na Tabela 1, nas fermentações onde foram empregadas concentrações iniciais de 20 g L<sup>-1</sup> de substrato (açúcares totais) o fungo foi capaz de produzir 0,28 g L<sup>-1</sup> (P) de exopolissacarídeo, concomitantemente com 3,02 g L<sup>-1</sup> de biomassa celular (P<sub>X</sub>) em 96 horas de cultivo. Importante notar também que o fungo foi bastante efetivo no consumo de substrato, assimilando mais que 90% do conteúdo de açúcares totais (Y<sub>C</sub> 93.79%). Máximo rendimento em exopolissacarídeo (Y<sub>P/S</sub>) foi verificado entre 24 e 72 horas de cultivo (0,02 g g<sup>-1</sup>). Já em relação ao rendimento em biomassa micelial (Y<sub>X/S</sub>), o máximo valor foi encontrado em 96 horas (0,16 g g<sup>-1</sup>).

Na Tabela 2 estão descritos os parâmetros fermentativos referente as fermentações conduzidas com 40 g L<sup>-1</sup> de substrato. O fungo produziu um conteúdo três vezes superior de lasiodiplodana (0,8 g L<sup>-1</sup>). Da mesma forma, o aumento da concentração inicial do substrato também contribuiu para maior crescimento micelial (10,32 g L<sup>-1</sup>). O substrato foi efetivamente assimilado em 96h de cultivo, onde foi verificado consumo de 88,85% (Y<sub>C</sub>) do substrato. Os maiores valores de rendimento em EPS (Y<sub>P/S</sub>) foram encontrados entre 48 e 96 horas (0,02 g g<sup>-1</sup>).

Produtividades volumétricas em biomassa micelial (Y<sub>X/S</sub>) superiores foram encontradas ao longo da fermentação quando comparadas aos cultivos onde foram utilizados 20 g L<sup>-1</sup> de concentração inicial de substrato. O valor máximo de Y<sub>X/S</sub> foi de 0,34 g g<sup>-1</sup> em 72 horas de cultivo. Similarmente, o aumento da concentração inicial do substrato também contribuiu para maior assimilação dos açúcares do meio (Q<sub>P</sub>).

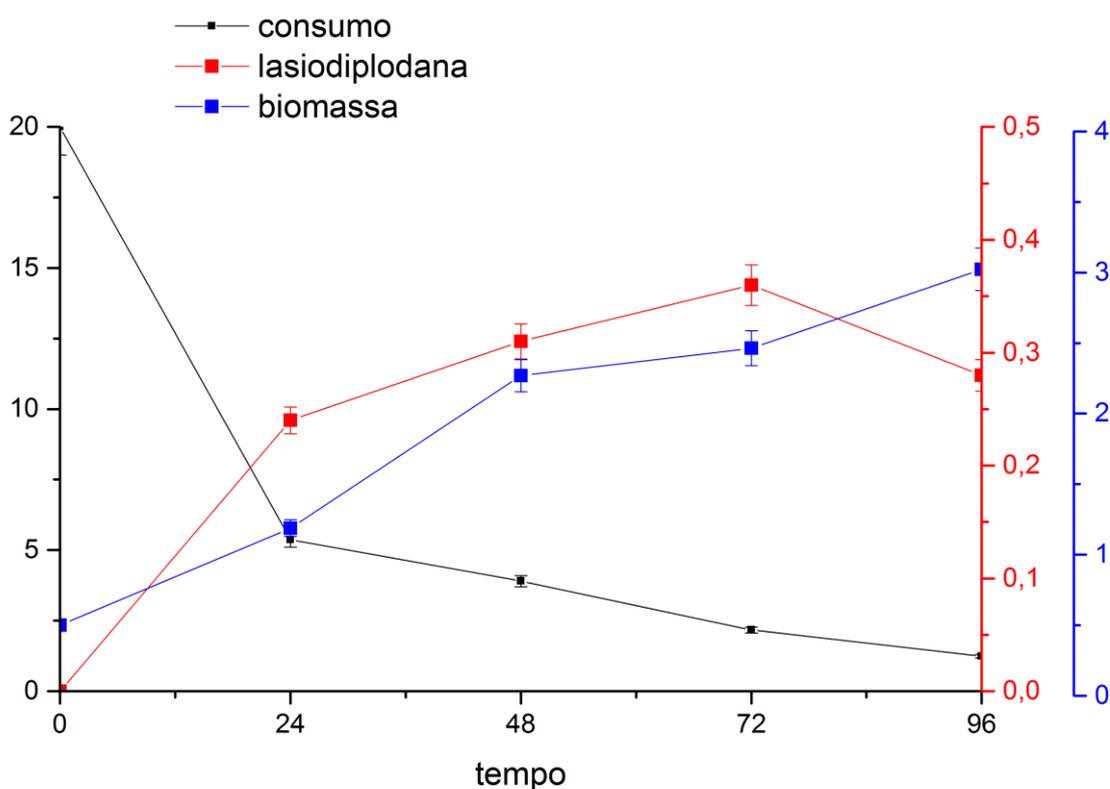
Ao avaliar as fermentações conduzidas com 20 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup> de substrato inicial, observa-se que de fato o aumento da concentração dos açúcares do meio contribuiu para melhor desempenho do processo. São verificados aumentos de rendimentos em EPS (Y<sub>P/S</sub>) e em biomassa micelial e (Y<sub>S/X</sub>). Entretanto, o desempenho do fungo em meio a base de melaço de soja é inferior ao verificado em meios com glicose ou sacarose (CUNHA et al. 2012; KAGIMURA et al. 2015).

Conforme pode ser observado nas figuras 2 e 3 o fungo *L. theobromae* MMPI mostrou elevado potencial de assimilação de substrato nas duas condições de cultivo (20 e 40 g L<sup>-1</sup>), sendo observado consumo quase completo do substrato nos dois

casos. Para a fermentação com meio de cultivo de  $20 \text{ g L}^{-1}$  a máxima produção de lasiodiplodana foi observado em 72 horas, havendo uma queda após esse período de tempo. Essa pequena redução no conteúdo de lasiodiplodana após as 72 horas está associada a possível produção de  $(1 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-glucanase}$ , como já descrito por Cunha et al. (2012).

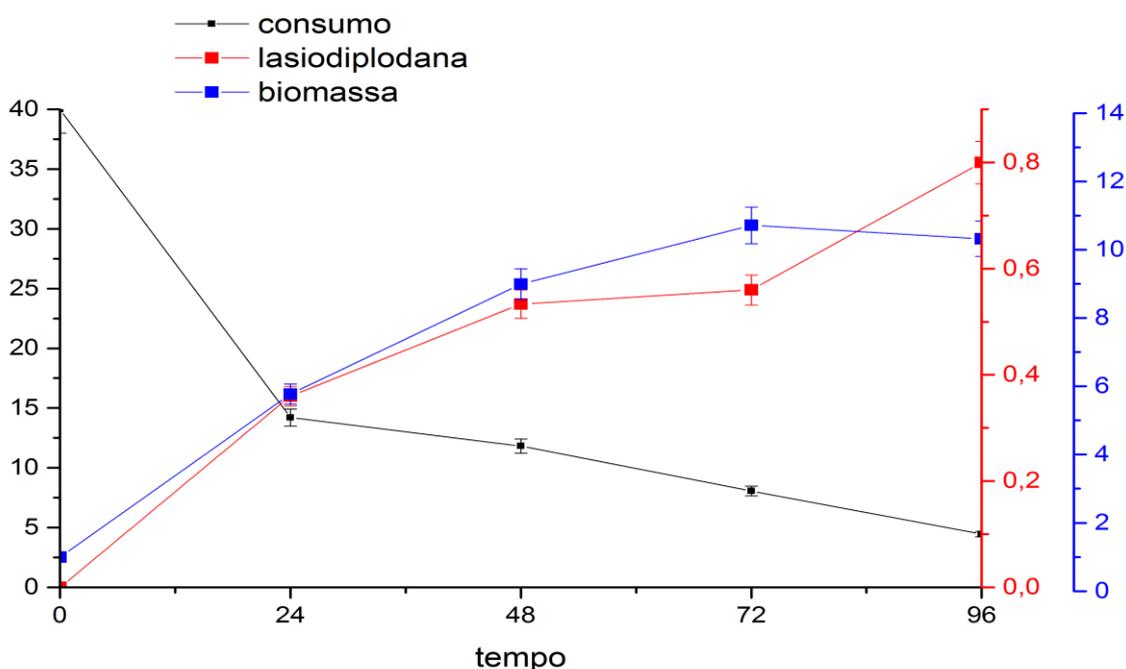
Comportamento diferente em relação a produção de EPS, entre 72 e 96 horas, foi verificado nos cultivos com maior conteúdo inicial de substrato, sendo verificado um aumento de produção de EPS (43%) entre 72 horas ( $0,56 \text{ g L}^{-1}$ ) e 96 horas ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Possivelmente maiores concentrações de substrato podem ter inibido a síntese e/ou a atividade catalítica da  $(1 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-glucanase}$ .

Figura 2 - Perfil da fermentação do melado de soja com concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$ .



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 3 - Perfil da fermentação do melão de soja com concentração de 40 g L<sup>-1</sup>.



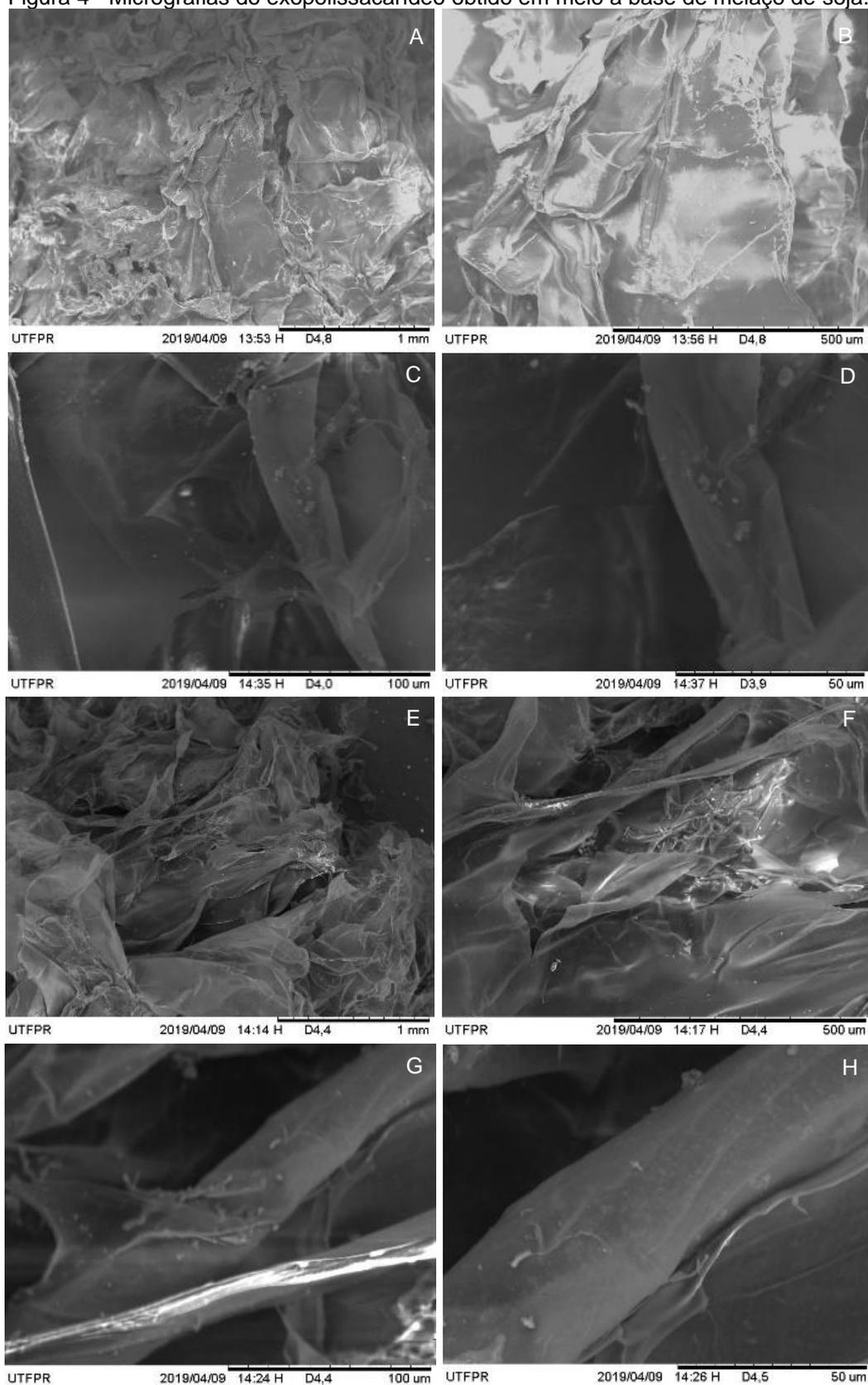
Fonte: Autoria Própria (2019).

## 5.2 Caracterização da lasiodiplodana por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 4 estão demonstradas as micrografias da lasiodiplodana obtidas em meio com 20 g L<sup>-1</sup> de substrato (LAS-20) e 40 g L<sup>-1</sup> (Las-40), nas amplitudes de 60 X, 200 X, 800 X e 1500 X.

As amostras apresentaram estruturas superficiais na forma de filmes finos com aspecto translúcido, com superfícies irregulares contendo regiões lisas e algumas regiões com dobras ao longo de seu comprimento. Pequeno número de estruturas granulares também foram verificadas ao longo da área superficial do biopolímero. Importante notar que, aparentemente, a concentração do substrato não tem influência significativa na estrutura morfológica do exopolissacarídeo obtido. Morfologia similar foi verificada em exopolissacarídeo produzido por *Neodeightonia phoenicum*, em estudos realizados por Fonseca et al. (2019). Kagimura et al. (2015) verificaram a presença de estruturas granulares em micrografias do exopolissacarídeo lasiodiplodana (1 →6)-β-D-glucana) obtido em cultivo submerso em reator de tanque agitado.

Figura 4 - Micrografias do exopolissacarídeo obtido em meio a base de melão de soja.



Lasio-20 em amplitudes de 20X (A), 200X (B), 800X (C) e 1500X (D). Lasio-40 em amplitudes de 20X (E), 200X (F), 800X (G), 1500X (H).

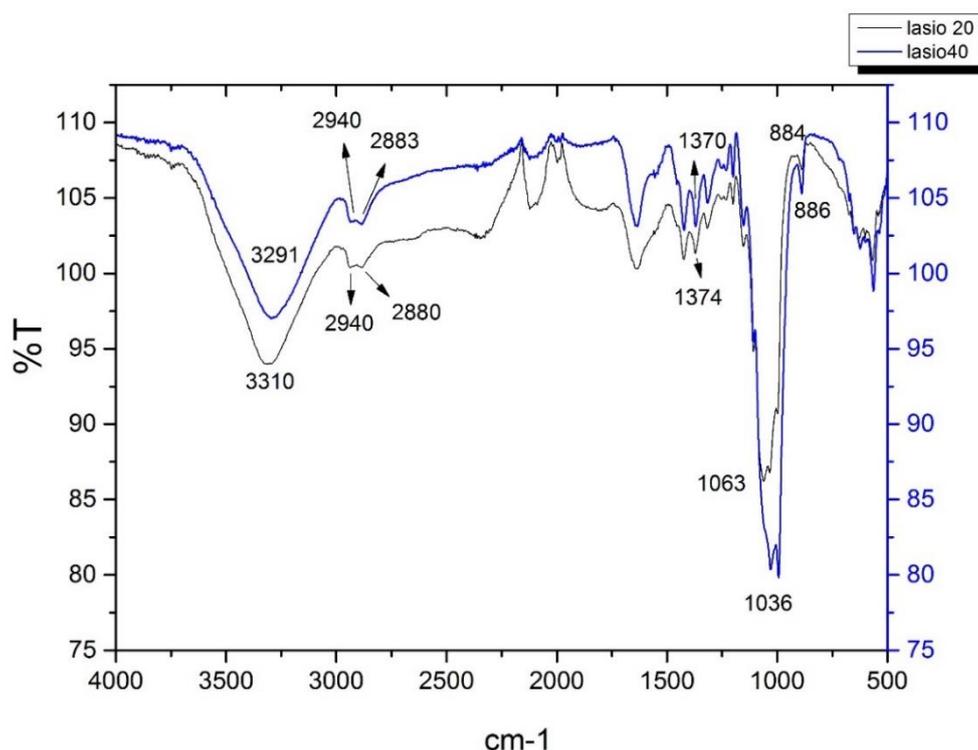
Fonte: Autoria Própria (2019).

### 5.3 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FT-IR de Lasio-20 e Lasio-40 estão demonstrados na Figura 5. Ambos os espectros foram semelhantes entre si, demonstrando sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de forte intensidade em 3310  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-20) e 3291  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-40) são atribuídas às vibrações de alongamento de OH (PECIN et al. 2018). As bandas em 2940  $\text{cm}^{-1}$  e 2883  $\text{cm}^{-1}$  na amostra Lasio-40 e em 2940  $\text{cm}^{-1}$  e 2880  $\text{cm}^{-1}$  na Lasio-20 foram atribuídas ao estiramento C-H  $\text{sp}^3$ .

As bandas de fraca intensidade em 1374  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-20) e 1370  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-40) foram atribuídas a vibrações de deformação de CH e OH típicas de carboidratos (ALZORQI et al., 2016). As bandas em 1063  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-20) e 1036  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-40) são atribuídas a vibração de alongamento C-O de anel piranose CALEGARI et al., 2017) e as bandas em 884  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-20) e 886  $\text{cm}^{-1}$  (Lasio-40) foram atribuídas a configuração  $\beta$ -glicosídica (THEIS et al., 2019).

Figura 5 - Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana obtida a partir de 20  $\text{gL}^{-1}$  (Lasio-20) e 40  $\text{gL}^{-1}$  (Lasio-40) de substrato.

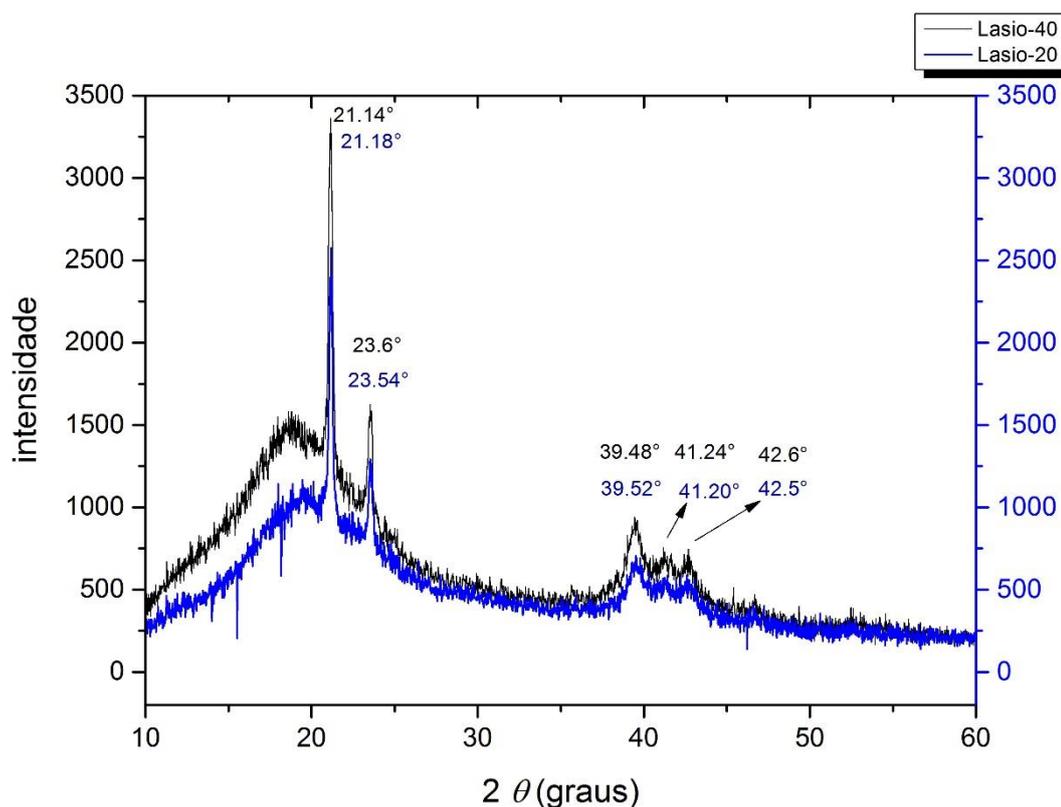


Fonte: Autoria Própria (2019).

#### 5.4 Caracterização por Difração de Raios-X

Na Figura 6 está representado o perfil difratométrico dos biopolímeros produzidos. Conforme pode ser verificado o difratograma obtido revela amostras com perfil característico de matriz amorfa, sem predominância de picos agudos. Observa-se dois picos mais pronunciados com valores próximos a  $21^\circ$  e  $23^\circ$  a  $2\theta$ . Tais picos indicam que o polissacarídeo estudado apresenta regiões com certa orientação molecular. Resultados semelhantes foram observado nos estudos de Calegari (2017) e Theis (2017). Picos com menor intensidade foram observados em valores próximos a  $39^\circ$ ,  $41^\circ$  e  $42^\circ$ .

Figura 6 - Difratogramas das amostras de lasiodiplodana produzidas.

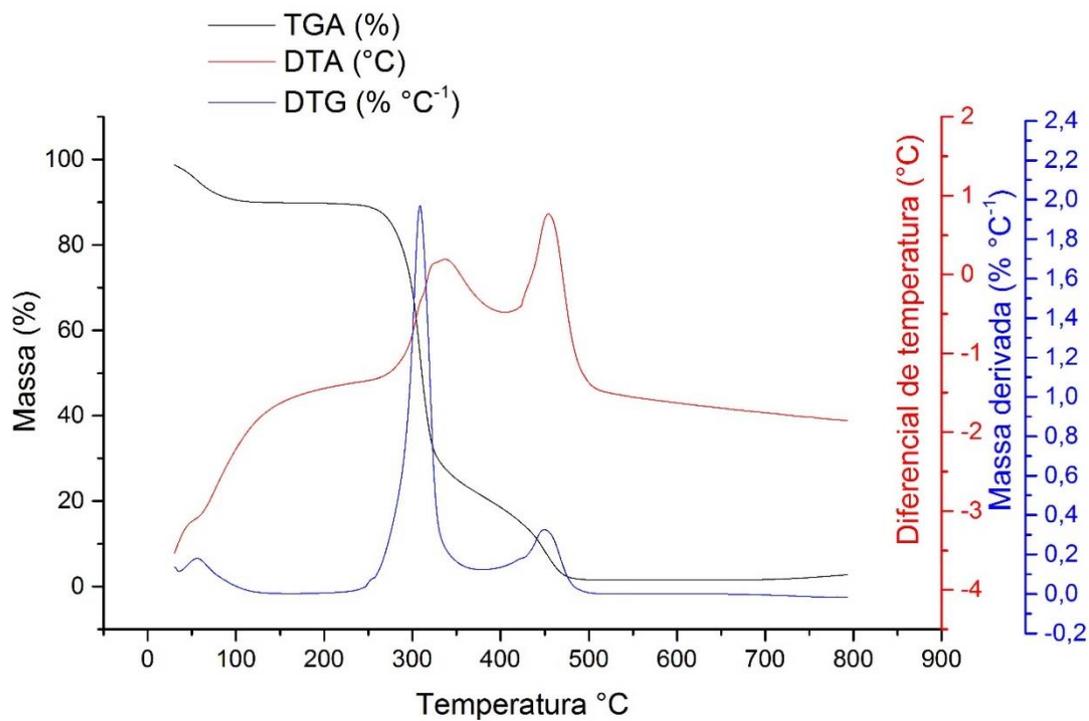


Fonte: Autoria Própria (2019).

#### 5.5 Caracterização por Análise térmica

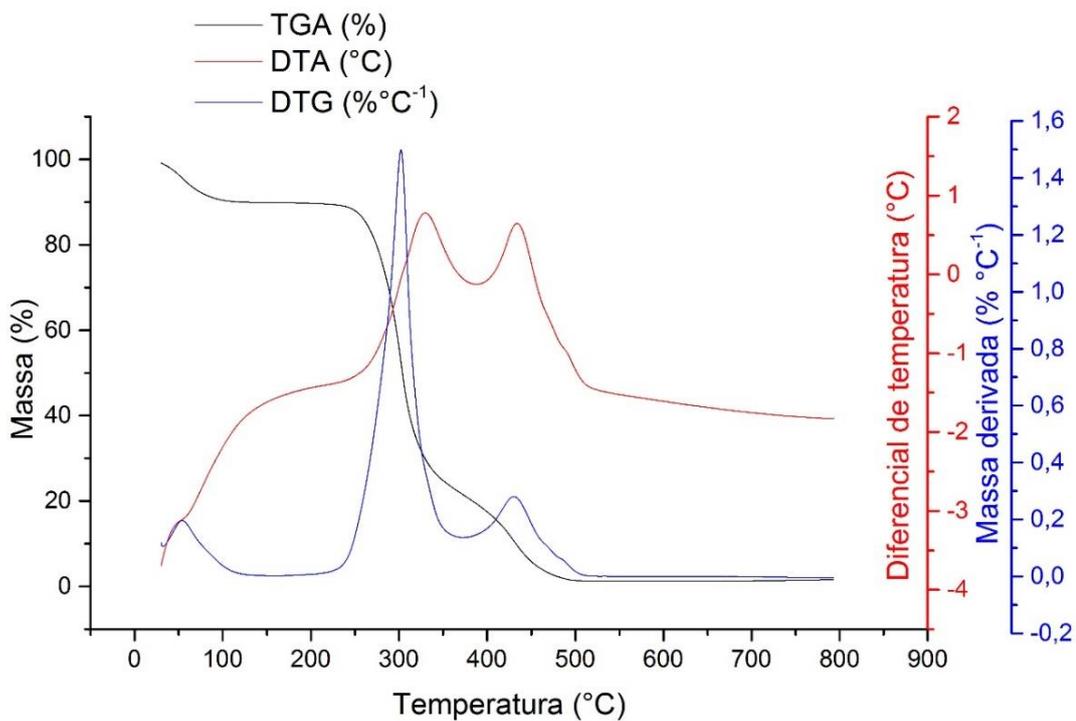
Nas Figuras 7 e 8 estão apresentados os comportamentos térmicos das amostras de lasiodiplodana, através das curvas TG (termogravimétrica), DTG (termogravimetria derivada) e DTA (térmica diferencial).

Figura 7 - Termograma das amostras de lasiodiplodana (Las-20).



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 8 - Termograma das amostras de lasiodiplodana (Las-40).



Fonte: Autoria Própria (2019).

Na Figura 7 estão representadas as curvas de perfil térmico da lasiodiplodana produzida na condição de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de concentração inicial de substrato. Pela curva TG são observados três eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu até  $130 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo associada a perda de água de adsorção, e evidenciado pelo pico endotérmico com sutil curvatura em  $58,8 \text{ }^\circ\text{C}$  na curva do DTA. Em seguida ocorre dois eventos consecutivos de perda de massa. O primeiro ocorreu até  $327 \text{ }^\circ\text{C}$ , indicado pelo pico exotérmico em  $335 \text{ }^\circ\text{C}$  e sendo atribuído a degradação da amostra. O seguinte e último evento de perda de massa ocorreu até  $489 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo indicado pelo pico exotérmico em  $455 \text{ }^\circ\text{C}$  na curva DTA e representando a oxidação final da amostra.

Perfil térmico similar foi observado nas amostras de Las-40 conforme verificado no termograma descrito no gráfico 8. Foram observados três eventos de perda de massa, onde o primeiro ocorreu até  $115 \text{ }^\circ\text{C}$ , indicado por um pico endotérmico sutil na curva DTA indicado em  $58 \text{ }^\circ\text{C}$ , e correspondendo a perda de água de hidratação. O segundo evento ocorreu até  $319 \text{ }^\circ\text{C}$ , indicado pelo pico exotérmico em  $330 \text{ }^\circ\text{C}$  na curva DTA e correspondendo a degradação da amostra. O último evento ocorreu até  $495 \text{ }^\circ\text{C}$ , indicado pelo pico exotérmico em  $455 \text{ }^\circ\text{C}$  (curva DTA) e correspondendo a oxidação final da amostra.

## 6. CONCLUSÃO

Melaço de soja demonstrou ser um potencial substrato para o preparo de meio de cultivo de baixo custo para a produção de lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* MMPI.

A concentração inicial de açúcares no meio de cultivo demonstrou ter influência tanto sobre a produção e rendimento em lasiodiplodana, como sobre a produção de biomassa micelial. O uso de maiores concentrações de substrato promoveu incremento de três vezes na produção final do biopolímero, e melhorias no rendimento e produtividade em lasiodiplonada.

As análises de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) das amostras mostraram bandas características de polissacarídeos com configuração  $\beta$ -glicosídica, típico da (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana produzida pelo *L. theobromae* MMPI.

Microscopia eletrônica de varredura revelou um biomaterial contendo área superficial com aspectos de filmes finos, translúcido, com regiões contendo dobras ao longo de sua extensão, além da presença de algumas estruturas granulares distribuídas sobre a superfície.

A análise por difração de raios-x demonstrou que ambas amostras apresentam estrutura tipicamente amorfa, mas contendo regiões com certa organização molecular.

As análises térmicas demonstraram que as amostras de lasiodiplodana obtidas no meio à base de melaço de soja apresentam elevada estabilidade térmica, considerando os padrões de processos comumente empregados pelas empresas de alimentos, farmacêuticas e químicas.

Estudos posteriores são importantes e necessários para otimização da produção de lasiodiplodana pelo ascomiceto *L. theobromae* MMPI usando meio formulado a base de melaço de soja.

## Referências

ALZORQI, I.; SUDHEER, S.; et al. Ultrasonically extracted  $\beta$  D glucan from artificially cultivated mushroom , characteristic properties and antioxidant activity. **ULTRASONICS SONOCHEMISTRY**, p. 3–5, 2016.

ARANDA-SELVERIO, Gabriel et al . Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010 .

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC. **Internation**. 16 ed., v.2, Maryland, 1997.

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)- $\beta$ -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.

CHEN, S. C.; LU, M. K.; CHENG, J. J.; WANG, D. L. Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated from medicinal fungi. **Microbiology Letters FEMS**, v. 249, n. 2, p. 247-254, 2005.

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

EMBRAPA. Embrapa soja: Soja em números (safra 2017/2018). Londrina: 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em 05 novembro 2019.

FERNANDES, G. R.; MIGUEL, D. P. Detecção dos açúcares da soja. **Caderno De Pós-Graduação da FAZU** v.2, 2012.

FULL, T. D.; JUNG, D.O.; MADIGAN, M.T. Production of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology** v. 43, n. 4, p.377-384, 2006.

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  $\beta$ -Dglucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125-130, 2015.

GOMES, R. J.; CASTRO-GÓMES, R. J. H.; SPINOSA, W. A. **Produção de Beta-Glucana de *Saccharomyces fagilis* cultivada em soro de leite**. ISSN:2525-6831 v.1, 2016. Disponível em <https://proceedings.galoa.com.br/cpm/trabalhos/producao-de-beta-glucana-de-saccharomyces-fagilis-cultivada-em-soro-de-leite?lang=pt-br> acesso: 17 out. 2017.

JUNG, K.; HA, Y.; HA, S. K.; HAN, D. U.; KIM, D. W.; MOON, W. K.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucan to Swine Influenza Virus by increased production of Interferon- $\gamma$  and Nitric Oxide. **Journal of Veterinary Medicine** v. 51, n. 2, p. 72-76, 2004.

KAGIMURA, F. Y.; 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 $\rightarrow$ 6)-glucan (Iasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation **Carbohydrate Polymers**, v.127, p. 390-399, 2015.

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.

LONG, C. C.; GIBBONS, W. R. Conversion of soy molasses, soy solubles, and dried soybean carbohydrates into ethanol. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 6, p 62–68, 2013.

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.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMES, R. J. H.  $\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina**, v.29, n.3, p.631-650, 2008.

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

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

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. 65 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

RAHAR, S.; SWAMI, G.; NAGPAL, N.; NAGPAL, M. A.; SINGH, G. S. Preparation, characterization, and biological properties of β-glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.2, p. 94-103, 2011.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. Dissertação (Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ROMÃO, E. B. **Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja**. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SARROUH, B. F.; DOS SANTOS, J. C.; CUNHA, M. A. A.; BRANCO, R. F. Potential biomass resources for cellulosic ethanol production in Brazil: availability, feedstock analysis, feedstock composition, and conversion yields. **Biofuels in Brazil**. 1 ed., p. 97-123, 2014.

SECHI, N. S. M.; CALEGARI, G. C.; FONSECA, M. S.; MARQUES, P. T.; CUNHA, M. A. A. Obtenção e caracterização de lasiodiplodana fosforilada com trimetafosfato de sódio. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v.12, n.1, 2017.

SILVA, C. R. **Remoção de galactooligossacarídeos em melaço de soja para obtenção de produtos de interesse industrial**. Dissertação (Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

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.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasse by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology** v.99, p.8156-8163, 2008.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; FOGLIA, T.A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters** v. 29, n. 9, p. 1314-1347, 2007.

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de  $\beta$ -(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.

STÜBLER, D.; BUCHENAUER, H. Antiviral activity of the glucan Lichenan (Poly- $\beta$ (1→3,1→4)D-anhydroglucose). **Journal of Phytopathology** v. 144, n. 1, p. 37-43, 1996.

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)- $\beta$ -D-Glucan Lasiodiplodan): Carboxymethylation, Thermal Behavior, Antioxidant and Antimicrobial Activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19–33, 2017.

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  $\beta$ -(1→6)-D-glucan type and a  $\beta$ -(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

YILDIZ, H., & KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, 72, 41–46, 2018.