

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

HOLDAI CARLOS EMERICH HERINGER

**APROVEITAMENTO DE LEVEDURA RESIDUAL CERVEJEIRA COMO
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BETA-GLUCANA E BIOMASSA
MICELIAL**

PATO BRANCO

2023

HOLDAI CARLOS EMERICH HERINGER

**APROVEITAMENTO DE LEVEDURA RESIDUAL CERVEJEIRA COMO
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BETA-GLUCANA E BIOMASSA
MICELIAL**

**VALORIZATION OF SPENT BREWER'S YEAST IN THE INTEGRATED PRODUCTION OF BETA-
GLUCAN AND SINGLE-CELL PROTEIN**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

PATO BRANCO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

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



HOLDAI CARLOS EMERICH HERINGER

APROVEITAMENTO DE LEVEDURA RESIDUAL CERVEJEIRA COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BETA-GLUCANA E BIOMASSA MICELIAL

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 24 de Agosto de 2023

Dr. Mario Antonio Alves Da Cunha, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Maria Ines Rezende, Doutorado - Universidade Estadual de Londrina (Uel)

Dr. Ricardo De Freitas Branco, Doutorado - Universidade Federal Fluminense (Uff)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/08/2023.

RESUMO

Grandes quantidades de levedura residual são geradas no processo de produção de cervejas, sendo esta biomassa rica em carboidratos, proteínas, nitrogênio solúvel, vitaminas e minerais, o que favorece seu uso como substrato em plataformas microbiológicas. Levedura residual cervejeira foi estudada como uma matéria-prima alternativa de baixo custo para a produção sustentável de uma β -D-glucana microbiana (lasiodiplodana). O potencial de utilização da biomassa micelial (single cell-protein) gerada na produção da β -glucana também foi avaliado como estratégia de biorrefinamento integrado. Cinco protocolos de lise celular foram estudados para obter um lisado celular de levedura rico em nutrientes, sendo a hidrólise enzimática a mais eficiente, com resultados de 46.29 g 100 g⁻¹ de componentes intracelular solúvel e 65.8 g 100 g⁻¹ de proteína solúvel. A suplementação mineral do meio de fermentação foi avaliada e a proteína unicelular (SCP) produzida foi caracterizada quanto a composição nutricional, aminoácidos e perfil lipídico. *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi eficaz na co-produção de lasiodiplodana ((1→6)- β -D-glucana)) e SCP em um meio constituído por sacarose (60 g L⁻¹), lisado celular (7 g L⁻¹ de proteínas totais), MgSO₄.7H₂O (0,5 g L⁻¹) e K₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹). A hidrólise enzimática com Alcalase promoveu ruptura celular mais significativa e maior liberação de componentes intracelulares solúveis comparada aos demais processos de lise celular estudado. A biomassa micelial obtida demonstrou ser rica em proteínas (30,54 g 100 g⁻¹) e continha todos os aminoácidos essenciais com altas concentrações de leucina (69 mg g⁻¹), lisina (62,2 mg g⁻¹), valina (44,2 mg g⁻¹) e treonina (43,2 mg g⁻¹). A coprodução de lasiodiplodana e SCP pelo fungo *L. theobromae* MMPI pode ser uma alternativa de bioprospecção economicamente promissora.

Palavras-chave: lise celular; exopolissacarídeo; proteína fúngica; lasiodiplodana; *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

ABSTRACT

Large amounts of brewer's residual yeast are generated in the beer production process, and this biomass is rich in carbohydrates, proteins, soluble nitrogen, vitamins, and minerals, which favors its use as a substrate in microbiological platforms. Spent brewer's yeast was studied as a low-cost alternative feedstock for sustainably producing a high-added-value microbial β -D-glucan (lasiodiplodan). The potential of using the mycelial biomass (single cell-protein) generated in the production of β -glucan was also evaluated as a strategy of integrated biorefining. Five cell lysis protocols were studied to obtain a nutrient-rich yeast cell lysate, with enzymatic hydrolysis being the most efficient, with results of 46.29 g 100 g⁻¹ of soluble intracellular components and 65.8 g 100 g⁻¹ of soluble protein. Mineral supplementation of the fermentation medium was assessed, and the single-cell protein (SCP) produced was characterized by the nutritional composition, amino acid, and lipid profiles. *Lasiodiplodia theobromae* MMPI was effective in the co-production of lasiodiplodan ((1→6)- β -D-glucan)) and SCP in a medium consisting of sucrose (60 g L⁻¹), cell lysate (7 g L⁻¹ of total proteins), MgSO₄·7H₂O (0.5 g L⁻¹) and K₂HPO₄ (0.5 g L⁻¹). Enzymatic hydrolysis with Alcalase promoted more significant cell rupture and greater release of soluble intracellular components compared to other cell lysis processes studied. Mycelial biomass obtained was rich in protein (30,54 g 100 g⁻¹) and contained all essential amino acids with high concentrations of leucine (69 mg g⁻¹), lysine (62,2 mg g⁻¹), valine (44,2 mg g⁻¹) and threonine (43,2 mg g⁻¹). Co-production of lasiodiplodan and SCP by the fungus *L. theobromae* MMPI may be an economically promising bioprospecting alternative.

Keywords: cell lysis; fungal protein; lasiodiplodan; *Lasiodiplodia theobromae* MMPI

LISTA DE IUSTRAÇÕES

Figura 1 - β -glucanas: configurações $\beta(1\rightarrow3)$ (a), $\beta(1\rightarrow4)$ (b) e $\beta(1\rightarrow6)$ (c)	19
Figura 2 - Representação da estrutura molecular da $(1\rightarrow6)$ - β -D-glucanas (lasiodiplodana)	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica da levedura de cerveja	14
Tabela 2 - Fungos produtores de extrato de polissacarídeos.....	18
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial (2^2).....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	BIOMASSA DE LEVEDURA CERVEJEIRA	13
3.2	POLISSACARÍDEOS DE INTERESSE INDUSTRIAL	16
3.2.1	β-Glucana e lasiodiplodana	18
3.3	BIOMASSA MICELIAL (<i>SINGLE CELL PROTEIN</i>)	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL	24
4.1.1	Obtenção e preparo da levedura residual cervejeira	24
4.1.2	Lise Celular	24
4.1.2.1	Tratamento térmico por autoclavagem	24
4.1.2.2	Autólise com NaCl e acetato de etila	25
4.1.2.3	Hidrólise ácida	25
4.1.2.4	Plasmólise	25
4.1.2.5	Hidrólise enzimática	26
4.1.3	Avaliação da eficiência da lise	26
4.1.4	Microrganismo e preparo do inóculo	26
4.1.5	Cultivo submerso para produção de β-glucana e biomassa micelial	27
4.2	CARACTERIZAÇÕES ANALÍTICAS	29
4.2.1	Análise de Umidade	29
4.2.2	Lipídeos	29
4.2.3	Proteína bruta e nitrogênio orgânico total	30
4.2.6	Resíduo mineral fixo	31
4.2.7	Fibra alimentar e bruta	31
4.2.8	Carboidratos totais	31
4.2.10	pH	31
4.2.11	Determinação da eficiência do lise celular	31
4.2.12	Perfil de aminoácidos e composição lipídica	32
4.2.15	Determinação de carbono orgânico total (COT)	32
4.2.5	Quantificação do exopolissacarídeo (Lasiodiplodana) e biomassa micelial	33
4.2.16	Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e análise de difratometria de raios-X	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos obtidos a partir de plantas ricas em açúcares ou amido ainda são os principais substratos empregados na produção biotecnológica de produtos de interesse. No entanto, o uso competitivo de tais matérias-primas pelas indústrias de alimentos e rações representa um dilema, e neste contexto, o uso de fontes alternativas de carbono tem ganhado importância na biotecnologia industrial (KELLER et al., 2020). A busca por fontes alternativas de carbono pelas indústrias de base biotecnológica também tem sido impulsionada pela necessidade de redução de custos de produção e pela importância ambiental e econômica no aproveitamento e valorização de biomassas residuais.

Entre as diferentes biomassas geradas como subprodutos ou resíduos de processos fermentativos industriais, a biomassa de levedura cervejeira merece atenção em função das grandes quantidades geradas e por sua qualidade nutricional. A cerveja é uma das bebidas fermentadas mais antigas que o homem tem registro, sendo consumida em mais de 170 países e com produção mundial em torno de 1,94 bilhão de hectolitros no ano de 2018 (CONWAY, 2021). No processo industrial de produção de cervejas cerca de 15% do total dos subprodutos gerados corresponde a leveduras residuais (KERBY; VRIESEKOOP, 2017), sendo este o segundo maior resíduo gerado.

Os elevados conteúdos de proteínas, carboidratos e minerais tornam esta biomassa interessante para uso como ração animal, sendo este seu principal destino. Entretanto, produtos biotecnológicos de elevado valor agregado podem ser produzidos a partir da biomassa residual de leveduras cervejeiras. A biomassa residual de levedura apresenta elevado conteúdo de carbono (45-47% da massa seca), proteína bruta (15% a 49%), minerais e vitaminas (2% a 7%) (RACHWAŁ et al., 2020). Sua riqueza nutricional a torna atrativa como substrato em processos biotecnológicos para produção de produtos de elevado valor agregado.

Entre os diferentes produtos obtidos por processos biotecnológicos com mercado emergente tem-se os polissacarídeos. Para o mercado global de polissacarídeos e oligossacarídeos é estimado um crescimento de mais de 5% no período de 2020 a 2030, e movimentação de mais de 22 bilhões de dólares

(FACT.MR, 2021). Os polissacarídeos encontram diferentes aplicações nas mais variadas áreas do setor industrial, sendo usados como espessantes, estabilizantes, mimetizadores de gordura, umectantes, texturizantes e emulsificantes em alimentos. Alguns polissacarídeos apresentam funcionalidades biológicas como atividade anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogênica, cicatrizante entre outras.

Entre os polissacarídeos com propriedades biológicas e tecnológicas destacam-se as β -glucanas. Estas macromoléculas são comumente extraídas de parede celular de leveduras ou cereais como aveia e cevada em processos que comumente envolvem o uso de água quente, solventes orgânicos, ácidos e álcalis. Algumas β -glucanas têm sido descritas na literatura como polissacarídeos extracelulares como a lasiodiplodana, a qual tem demonstrado algumas propriedades biológicas como ação antiproliferativa, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, atividade antioxidante, antimicrobiana e redução da atividade de transaminase em ratos (CUNHA et al., 2012).

A recuperação e purificação de polissacarídeos microbianos extracelulares é bem mais simples e econômica comparada a extração a partir de parede celular, uma vez que envolve operações simples como filtração, centrifugação, precipitação com etanol e diálise, não sendo necessário o uso de produtos químicos agressivos.

Outro grupo de bioproduto com grande potencial mercado e perspectivas promissoras são as proteínas de origem microbiana, em especial as micoproteínas também conhecidas como proteínas unicelulares. O crescimento global da população, combinado com fatores como mudanças sócio demográficas aumentará a pressão sobre os recursos do mundo para fornecer não apenas mais, mas também diferentes tipos de alimentos (HENCHION et al., 2017). A demanda global por proteína está em fase de crescimento e parte dessa demanda poderia ser atendida a partir do aproveitamento de biomassa e recursos orgânicos renováveis. Neste contexto, a proteína unicelular tem despertado o interesse de pesquisadores de todo o mundo, cuja produção é realizada por algas e fungos.

No ano de 2020, o valor do mercado global de proteína unicelular alcançou 5,6 bilhões de dólares e deve crescer 5,3% até 2027(MARKET

REPORTS WORLD, 2022) . Parte da força motriz para este crescimento deve-se à consciência das pessoas sobre as vantagens ambientais de sua produção e questões de saúde desta proteína, bem como ao aumento do consumo de proteínas.

A produção de proteína celular tem algumas vantagens sobre as produções de proteína animal e vegetal, visto que sua produção não requer extensas áreas de terras ou grandes reservatórios para armazenamento, além da produção não ser afetada pelas estações e clima, nem contribuir para a liberação de gases que contribuem para o aquecimento global como na produção de proteína de origem animal.

A partir do exposto, o presente projeto estudou a produção integrada de dois bioprodutos a partir de levedura residual oriunda da indústria cervejeira. O potencial da levedura residual como substrato para a produção de um polissacarídeo extracelular do tipo β -D-glucana (lasiodiplodana, uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana) e biomassa micelial (fonte de proteína e lipídios) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi avaliada. A qualidade nutricional, potencial antioxidante e presença de compostos bioativos na biomassa micelial também foram objetos de estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a biomassa residual de levedura cervejeira como substrato de baixo custo para produção de β -glucana extracelular (1 \rightarrow 6- β -D-glucana, lasiodiplodana), e coprodução de biomassa micelial pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a biomassa residual cervejeira, avaliando parâmetros de qualidade nutricional (proteína bruta, carboidratos totais, lipídios (extrato etéreo), fibra bruta e umidade) e composição elementar (carbono e nitrogênio solúvel total).

Definir o melhor protocolo de lise celular da levedura residual cervejeira (tratamento com calor, autólise, hidrólise ácida, plasmólise e hidrólise enzimática).

Caracterizar os lisados celulares (material extracelular) quanto aos conteúdos de sólidos solúveis totais, componentes intracelulares solúveis, proteínas solúveis, carbono orgânico total, nitrogênio total e relação Carbono / nitrogênio.

Avaliar o potencial do resíduo de levedura cervejeira como substrato para a produção de β -glucana extracelular (1 \rightarrow 6- β -D-glucana) e biomassa micelial usando Metodologia de Planejamento Experimental.

Avaliar as melhores concentrações de substrato (lisado celular) e fonte de carbono (sacarose), visando máxima produção do exopolissacarídeo (lasiodiplodana) e biomassa micelial.

Caracterizar a biomassa micelial obtida em relação a sua composição proximal (proteína bruta, resíduo mineral fixo, lipídios totais, fibra alimentar e umidade), perfil lipídico e de aminoácidos.

Caracterizar a β -glucana (lasiodiplodana) produzida utilizando as técnicas de infravermelho com transformada de Fourier e difração de raios-x.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOMASSA DE LEVEDURA CERVEJEIRA

O processo de fabricação de cerveja convencional tem uma história extremamente longa e pode ser considerado um exemplo típico da biotecnologia tradicional, datando de aproximadamente 8 mil anos (FERREIRA et al., 2010).

Em 2020 a produção global de cerveja ultrapassou 182 bilhões de litros (CONWAY, 2021). No Brasil o setor cervejeiro possui grande expressão econômica, gerando cerca de 2,7 milhões de empregos ao longo de sua cadeia produtiva, além de movimentar 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional (CERVBRASIL, 2021). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da bebida, com uma produção estimada de 14 bilhões de litros no ano de 2020 (BRASIL, 2021).

Atrelada a sua produção, a indústria cervejeira gera quantidades significativas de subprodutos em várias etapas da sua produção (RACHWAŁ et al., 2020), sendo a levedura residual um dos principais subprodutos gerados. As leveduras são organismos unicelulares que pertencem ao reino fungi e são anaeróbicos facultativos, ou seja, podem se multiplicar em meio aeróbico e anaeróbicos. Na presença de oxigênio realizam respiração celular para metabolizar carboidratos, já na ausência de oxigênio é realizada a fermentação para tal metabolização (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O fermento residual proveniente da produção de cerveja é considerado o segundo maior subproduto gerado pelo processo. Cerca de 15% do total de subprodutos gerados é apenas o fermento residual (KERBY; VRIESEKOOOP, 2017). Este resíduo é recuperado através da sedimentação nos fermentadores, antes da etapa da segunda fermentação e maturação (OLAJIRE, 2020). A quantidade média de resíduo de levedura coletado, na produção de cerveja lager, é de cerca de 2,7 Kg de levedura por metro cúbico (m³) de cerveja produzida (HUIGE, 2006).

Tal subproduto, basicamente constituído por células de *Saccharomyces cerevisiae* residual, possui quantidades significativas de proteínas e carboidratos, como pode ser verificado na Tabela 2, além de vitaminas do

complexo B, ácido fólico e lipídeos (MARSON et al., 2020; OLIVEIRA; NETO, 2008).

Tabela 1 - Composição típica da levedura de cerveja

Componente (% base seca)	Levedura de cerveja
Proteína	45% - 60%
Glicoproteínas	5% - 10%
Polissacarídeos	25% - 35%
Polifosfatos	1% - 3%
Lípidios	4% - 7%
Ácidos nucleicos	4% - 8%

Fonte: Liu et al., (2016)

O fermento residual da produção de cerveja pode ser usado em diversos nichos, como na indústria de alimentos, como aditivo e ingrediente. Também pode ser utilizado como matéria-prima com o intuito de extrair compostos para a própria indústria ou em processos biotecnológicos para produzir outros compostos de interesse (RACHWAŁ et al., 2020).

Esta levedura também possui a viabilidade de ser empregada como aditivo para microrganismos produtores de compostos de valor agregado à indústria de alimentos, principalmente hidrolisados e autolisados (FERREIRA et al., 2010). Os autolisados possuem características químicas que permitem utilizá-los em fermentações, sendo adequados para produzirem compostos específicos para uso em alimentos (BERLOWSKA et al., 2017). Também podem ser usados como fonte alternativa de nitrogênio para microrganismos fermentadores (MATHIAS et al., 2017). Eles podem ser aproveitados de forma integral ou extraído algum componente selecionado, que pode ser derivado da parede celular e/ou da parte intracelular (FERREGUETI COSTA, 2004).

Os extratos obtidos a partir da levedura residual da cerveja possuem altos teores de aminoácidos essenciais, de aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular (JACOB; HUTZLER; METHNER, 2019).

O aproveitamento da levedura residual agrega valor comercial a este subproduto, contribuindo para redução de custo de produção, visto que não

haverá custos para sua destinação. Isto torna o processo mais sustentável dentro de toda cadeia produtiva e também contribui para redução de impactos ambientais (RACHWAŁ et al., 2020).

O extrato de levedura é nutricionalmente rico, especialmente em proteínas, pode ser obtido a partir da levedura residual por processos como autólise, plasmólise ou processos combinados. Este extrato contém partes solúveis, incluindo proteínas, fibras, minerais e nucleotídeos e pode ser usado como aditivo alimentar e fonte de nitrogênio para processos fermentativos (OLIVEIRA; DE; NETO, 2008).

Alves; Souza; Oliva Neto (2021) obtiveram extrato de levedura residual de cervejaria por processo de autólise, usando como estratégia um tratamento ácido (choque ácido) com o objetivo de ativar o sistema autolítico das células em condições estressantes de temperatura e pH. Tais autores avaliaram a influência dos parâmetros temperatura, concentração celular e concentração de ácido sulfúrico no processo de produção de autolisado de levedura, sendo obtido melhores rendimentos em proteínas e sólidos totais com tratamento ácido (H_2SO_4 10 $\mu\text{L/g}$ de levedura e pH final 4,4) a 60 °C (36,84% de proteína e 48,47% de sólidos totais) e elevação gradual da temperatura de 45 °C a 60 °C (41,20% de proteína e 58,48% de sólidos totais).

Autólise por tratamento térmico a 115 °C por 10 min e subsequente resfriamento em banho de gelo foi empregada por Zarei; Dastmalchi; Hamzeh-Mivehroud (2016), os quais obtiveram extrato de levedura com qualidade nutricional comparável aos disponíveis no mercado.

Li et al. (2011) reportaram que o extrato de levedura promoveu intenso crescimento celular de cultura mista isolada de solo rico em álcool polivinílico (PVA) na companhia Pacific Textiles C.o. (Jiangsu Province, China). O extrato também contribuiu para um incremento na produção de PVAases (enzimas que degradam álcool polivinílico), que são enzimas que têm um grande potencial em processos de biodesengorduramento por seu baixo impacto ambiental e baixo consumo de energia. Extrato de levedura mostrou ser um relevante suplemento nutricional em meio contendo glicerol residual como fonte de carbono em cultivos com o fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI para produção de β -glucana extracelular em reator de baixo cisalhamento (TABUCHI et al., 2021).

Similarmente, Cunha et al., (2012) reportaram extrato de levedura como melhor fonte de nitrogênio associado a glicose ou maltose para crescimento micelial e produção da β -glucana lasiodiplodana.

Extrato de levedura também foi estudado como um bioestimulante no cultivo de trigo sob estresse hídrico, e os resultados indicaram ganhos de produtividade e de qualidade dos grãos (HAMMAD; ALI, 2014).

3.2 POLISSACARÍDEOS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Polissacarídeos são macromoléculas formadas pela união de monossacarídeos e cuja a estrutura apresenta mais que 10 unidades monoméricas. São classificados como homopolissacarídeo, quando todas as unidades glicosídicas da macromolécula são do mesmo tipo como no caso da celulose e amido, constituídos apenas por unidades de glicose. Quanto a macromolécula é constituída por dois ou mais tipos de unidades glicosídicas, o polissacarídeo é denominado heterogêneo ou heteropolissacarídeo (FERREIRA, 2010). Alguns polissacarídeos são encontrados na parede celular, onde realizam funções de proteção contra estresses do meio exterior e funções estruturais. Alguns polissacarídeos podem ser excretados para fora da célula, sendo estes nomeados de exopolissacarídeos ou simplesmente EPS (CALEGARI et al., 2019; DONOT et al., 2012). Polissacarídeos podem ser de origem animal, como o glicogênio, e de origem vegetal, como celulose, amido e fibras (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005) ou de origem microbiana.

Os polissacarídeos possuem a capacidade de reter as moléculas de água, resultando em soluções coloidais e possibilitando o controle da atividade de água em produtos alimentícios. Podem ser denominados como gomas, hidrocolóides, mucilagens ou polissacarídeos solúveis em água, e são comumente utilizados como agentes espessantes e estabilizantes de emulsões (FILHO; VASCONCELOS, 2011).

A solubilidade dos polissacarídeos está diretamente ligada as suas estruturas moleculares e qualquer mudança que impossibilite a associação da macromolécula como insaturações e presença de grupos químicos como carboxilas, sulfato e fosfato resulta numa maior solubilidade. Por outro lado, em

um polissacarídeo com cadeia linear, a capacidade de solubilização diminui consideravelmente (GUO et al., 2017).

Os EPS produzidos por bactérias e fungos vem ganhando espaço nas indústrias de alimentos, cosméticos, entre outros nichos (OSEMWEGIE et al., 2020). Apesar de terem carboidratos como principal constituinte de sua composição, também podem apresentar outros componentes como proteínas, fosfolipídios, componentes orgânicos com diferentes grupos funcionais, ácidos nucleicos e também compostos inorgânicos (SINGH et al., 2011).

A produção de EPS em cultivos submersos destaca-se quando comparada a extração de polissacarídeos da parede celular microbiana ou de cereais. Isto ocorre em função da facilidade de recuperação e purificação do EPS do meio de cultivo onde foi produzido e a facilidade de produção em escala industrial (CUNHA et al., 2012; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; ORLANDELLI et al., 2016). Exopolissacarídeos podem ser recuperados de meios líquidos por processos que envolvem operações simples como precipitação com etanol, filtragem ou centrifugação e secagem (CUNHA et al., 2012). É de suma importância a escolha da fonte de carbono a ser utilizada no processo, uma vez que esta fonte funcionará como energia para os microrganismos, permitindo assim o crescimento microbiano (LIU et al., 2017). Na Tabela 3 estão descritos alguns fungos produtores de exopolissacarídeos.

Tabela 2 - Fungos produtores de expolissacarídeos

Microrganismo	Estrutura Química
<i>Aspergillus</i> sp Y.16	(1→6)-α-D-manopirana
<i>Auricularia auricula-judae</i>	(1→4)-α-D-glucana
<i>Fusarium solani</i> SD5	(1→4,6)-β-D-galactopiranosil
<i>Ganoderma atrum</i>	(1→3), (1→6)-β-glucana
<i>Ganoderma capense</i>	(1→4)-α-D-glucana
<i>Ladiodiplodia theobromae</i> (MMBJ)	(1→6)-β-D-glucana
<i>Lasioidiplodia theobromae</i> (MMLR)	(1→6) -β-D-glucana
<i>Ladiodiplodia theobromae</i> (MMPI)	(1→6) -β-D-glucana
<i>Lashnum</i> YM130	(1→2)-α-D-manana
<i>Lentinus fusipes</i>	(1→6)-α-D-galactopiranosil
<i>Pestalotiopsis</i> sp. BC55	(1→3)-β-D-glucana
<i>Pholiota nameko</i>	(1→3), (1→6)-β-D-glucana
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	(1→3)-β-D-glucana
<i>Polyporus umbellatus</i>	(1→6)-α-D-galactopirana

Fonte: Adaptado de Fonseca, (2019).

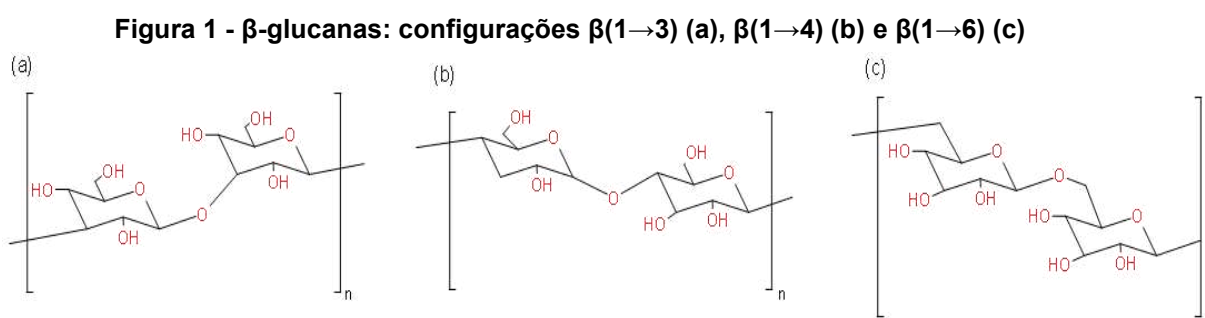
Os EPS podem apresentar potenciais aplicações terapêuticas, incluindo propriedades antitumorais, antivirais, imunomoduladoras, antioxidantes, antidiabéticas, redução de colesterol e ação prebiótica (DERONCELÉ THOMAS et al., 2018; OORLNDELLI et al., 2014). Estas propriedades tornam o uso dos exopolissacarídeos bastante atrativo e vantajoso, possibilitando desenvolver não somente produtos alimentícios, mas também fármacos e suplementos diversos (EL-NEWARY et al., 2017; FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Entre os EPS que tem ganhado atenção nos últimos anos tem se destacado as glucanas extracelulares, uma vez que além da facilidade da produção biotecnológica, elas apresentam várias propriedades tecnológicas e biológicas.

3.2.1 β-Glucana e lasiodiplodana

As glucanas são macromoléculas constituídas por apenas um tipo de unidade monomérica, ou seja, são homopolissacarídeos (CARBONERO et al., 2008). Algumas glucanas compõem a parte estrutural da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, e diferenciam-se pelo tipo de ligação entre

as unidades de glicose da cadeia principal, bem como pelas possíveis ramificações presentes na estrutura (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

As β -glucanas vegetais são normalmente encontradas na forma de cadeias lineares, contendo ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e algumas ligações β -(1 \rightarrow 4), enquanto as obtidas de algas e bactérias possuem cadeias lineares com ligações β -(1 \rightarrow 3). Já as β -glucanas produzidas por fungos e líquens são constituídas por ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) (NOSS et al., 2013). As diferenças estruturais influenciam diretamente na bioatividade da macromolécula, sendo que β -glucanas com cadeias muito curtas são consideradas inativas (AKRAMIENE et al., 2007). Na Figura 1 são mostrados exemplos de configurações estruturais de β -glucanas para melhor entendimento.



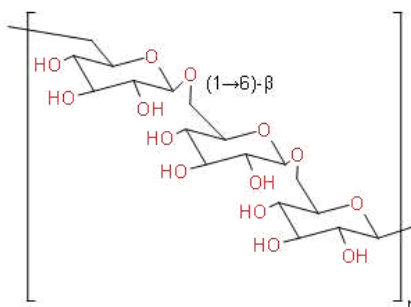
Fonte: Autoria própria (2021).

As β -glucanas chamam atenção pela bioatividade, principalmente pelo potencial de imunomodulação (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). São macromoléculas versáteis, pois podem ser empregadas em diversos setores da indústria, como alimentício, cosmético e farmacêutico, apresentando propriedades físicas como capacidade de geleificação, estabilização e espessamento (KAGIMURA et al., 2015a). Comumente apresentam ação anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica, auxiliam na proteção contra infecções (SOUZA et al., 2020). Também podem ser utilizadas como fibras alimentares, estando naturalmente presente na aveia, estimulando a redução dos níveis de colesterol e retardando a resposta glicêmica (RASANE et al., 2015).

As (1 \rightarrow 6)- β -D-glucanas são encontradas geralmente como compostos insolúveis da parede celular dos ascomicetos e basiodimicetos (LESAGE;

BUSSEY, 2006). O processo de isolamento deste composto é considerado complexo e necessita de várias etapas de extração incluindo extração com hexano, água quente, fria e com álcali (CORRADI DA SILVA et al., 2008). Contudo, a lasiodiplodana, uma (1→6)-β-D-glucana, produzida pelo microrganismo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI é secretada para o meio em cultivos submersos. O processo de recuperação desta macromolécula do meio líquido é bastante simples, envolvendo apenas precipitação com etanol e separação por centrifugação ou filtragem e subsequente secagem. A produção extracelular apresenta, portanto, melhor custo benefício em relação a extração da parede celular dos fungos (LIMA, 2019). A Figura 2 mostra a estrutura química da lasiodiplodana.

Figura 2 - Representação da estrutura molecular da (1→6)-β-D-glucanas (lasiodiplodana)



Fonte: adaptado de Malfatti et al., (2017).

Tem sido descrito na literatura científica diversos trabalhos que demonstram as propriedades bioativas das β-glucanas. Ikewaki et al., (2021) fizeram uma abordagem relacionada com a Indução de Imunidade Treinada objetivando o uso de β-glucanas como adjuvantes para o enfrentamento da Covid-19. Souza et al., (2020) desenvolveram biocurativos dérmico-epidérmicos, produzindo membranas lisas e transparentes, com o intuito de cobrir a lesão, para utilizar dos efeitos antiinflamatórios naturais da β-glucana, e dessa forma prevenindo e controlando infecções bacterianas, acelerando o processo de cura.

Foi observado que a lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana) obtida a partir do ascomiceto *L. theobromae* MMPI desempenha ação antioxidante, e que essa ação pode ser melhorada através da modificação química da glucana por carboximetilação, o que também melhora sua solubilidade em água (KAGIMURA

et al., 2015b). A adição de grupos carboximetílicos no polímero melhorou a solubilidade e aumentou a atividade antioxidante (THEIS et al., 2019).

Cunha et al., (2012) notaram que a (1→6)-β-D-glucana produzida a partir do microrganismo *Lasiodiplodia theobromae* possui atividade antiproliferativa em células de câncer de mama (MCF-7). A administração intracerebroventricular da lasiodiplodan em ratos evitou alterações comportamentais induzidas por D-penicilamina e lipoperoxidação no córtex de ratos (MALFATTI et al., 2017). Mello et al., (2017), investigaram os efeitos genotóxicos da lasiodiplodana, bem como sua capacidade protetora contra danos ao DNA, induzidos por doxorubicina, e o impacto gerado na expressão de genes e vias de resposta inflamatória. Os autores observaram que não houve indução de distúrbios na estabilidade do DNA, além da lasiodiplodana proteger o DNA contra danos do quimioterápico doxorubicina. Nissola, (2019) reportou atividade cicatrizante, estimulando a reepitelização, proliferação celular e biossíntese de colágeno de um hidrogel contendo a lasiodiplodana como princípio ativo.

Calegari et al., (2019) produziram e avaliaram as propriedades bioativas da (1→6)-β-D-glucano (lasiodiplodano) sulfatada, a qual apresentou capacidade antimicrobiana, principalmente contra *Candida albicans* e *Salmonella enterica typhirium*.

3.3 BIOMASSA MICELIAL (*SINGLE CELL PROTEIN*)

Proteínas são polímeros constituídos por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Embora existam cerca de 200 aminoácidos na natureza, o corpo humano metaboliza apenas 21 aminoácidos, sendo 12 sintetizados pelo próprio organismo (aminoácidos não essenciais) e 9 não são sintetizados, sendo estes chamados de essenciais e precisam ser obtidos pela alimentação (MITSUHASHI, 2014; NELSON; COX, 2018).

As células microbianas são excelentes fontes proteicas. A biomassa que constitui estes microorganismos possui em sua composição elevado conteúdo de proteínas, e portanto sendo comumente denominada de *Single Cell Protein* (SUMAN et al., 2015). Os termos proteína microbiana, *single cell protein* (SCP) e proteína unicelular têm o mesmo significado. Tais biomassas celulares tem

sido estudadas e representam uma forma alternativa em relação as proteínas vegetais e animais. A produção de proteína de origem animal traz impactos negativos para o ambiente, como aumento da emissão de gases de efeito estufa e aumento da demanda por água e terra (HENCHION et al., 2017). Em contrapartida, a produção de proteína microbiana traz vantagens como a não dependência do clima, não necessidade de grandes áreas, e nem de grandes reservatórios de água (MEKONNEN; HOEKSTRA, 2014).

Outras vantagens destas fontes proteicas, incluem a possibilidade de produção em biorreatores de forma rápida e sem a necessidade de grandes áreas, e a possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como substratos, o que contribui para o aproveitamento e transformação de resíduos em material de interesse comercial (NATANI LUPATINI et al., 2013).

Um dos grandes desafios das indústrias de biotecnologia e farmoquímica é a correta destinação das biomassas celulares oriundas dos microorganismos empregados nos diferentes processos biotecnológicos, visto que comumente são resíduos e não o produto de interesse. Os principais destinos destas proteínas são a produção de ração animal e fertilizantes (CRISTINA BUENO, 2016). Nas biomassas celulares além das proteínas também se encontram carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e ácidos nucleicos (SUMAN et al., 2015).

As biomassas celulares possuem elevado teor proteico e isso indica seu potencial na alimentação humana e animal, entretanto além do teor proteico é fundamental que estas biomassas não contenham substâncias tóxicas (NATANI LUPATINI et al., 2013). levedura de cervejaria pode substituir 50% da proteína da farinha de peixes empregada em rações, sem efeitos negativos na performance dos peixes alimentados. Além disso, a inclusão de até 30% de levedura de cervejaria na dieta melhorou a eficiência alimentar. Neste contexto, como alimento proteico, a levedura de cervejaria tem sido incluída em formulações de dietas comerciais para várias espécies de peixes, incluindo salmonídeos (FERREIRA et al., 2010).

Tem sido reportado que uma alimentação com alto teor proteico, porém com proteína de qualidade, traz vantagens como, redução de perda de massa muscular, controle dos fatores de riscos cardiometabólicos e redução de peso

(SOKOLOWSKI et al., 2020). As características de uma proteína de qualidade estão associadas à sua composição de aminoácidos e a facilidade com que o organismo digere determinada proteína (BURD et al., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL

4.1.1 Obtenção e preparo da levedura residual cervejeira

A levedura residual foi fornecida por uma micro-cervejaria localizada na cidade de Pato Branco, Paraná, e foi mantida sob congelamento a -18°C até utilização.

Inicialmente a biomassa de levedura foi submetida a filtração para remoção de impurezas físicas oriundas da fermentação e centrifugação para remoção de resíduo de cerveja, seguindo protocolo descrito por Jacob et al. (2019), com pequena adaptação. A levedura foi dispersa em água destilada (10% de matéria seca) e mantida sob agitação (150 rpm em incubadora orbital a 25°C) por 5 minutos em frascos Erlenmeyer de 500 mL (volume de trabalho 250 mL); sendo então passada em peneira com malha de 0,5 mm (35 Mesh) e centrifugada por 5 minutos a $1350 \times g$ em frascos de 250 mL. O sobrenadante do processo de centrifugação foi descartado e a levedura sedimentada foi novamente dispersa em água destilada (10% de matéria seca), mantida sob agitação por 5 min e centrifugada nas mesmas condições.

Na sequência, a biomassa lavada e centrifugada foi suspensa em água (15% m/v) para então ser submetida ao rompimento celular, sendo avaliado cinco protocolos de rompimento celular (lise celular): tratamento térmico (autoclavagem), autólise em meio contendo NaCl e acetato de etila, hidrólise ácida, plasmólise e hidrólise enzimática.

4.1.2 Lise Celular

4.1.2.1 Tratamento térmico por autoclavagem

Para obtenção do extrato lisado por processo de autoclavagem foi seguido protocolo descrito por Zarei; Dastmalchi; Hamzeh-Mivehroud (2016).

Uma suspensão de células de levedura residual foi preparada pela dispersão de 500 g da biomassa celular em 2 L de água deionizada (milli-Q). A suspensão foi autoclavada a 115 °C por 10 min seguido de rápido resfriamento em banho de gelo. O debrí celular foi separado por centrifugação a 4000 g a 4 °C por 10 min.

4.1.2.2 Autólise com NaCl e acetato de etila

A autólise foi conduzida em meio contendo NaCl e acetato de etila. Em um volume de 200 mL de suspensão celular (15% m/v) foram adicionados NaCl (0,086 mol L⁻¹) e acetato de etila (0,051 mol L⁻¹) e o pH foi ajustado para 6,5. A suspensão foi aquecida a 50 °C por 24 h sob com agitação constante de 100 rpm em incubadora orbital. Após a autólise a suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo seu sobrenadante o autolisado (JACOB; HUTZLER; METHNER, 2019).

4.1.2.3 Hidrólise ácida

Na autólise em meio ácido uma suspensão celular (15% m/v) teve o pH ajustado para 5,5 com solução de HCl 1 mol L⁻¹ e submetida a aquecimento a 55 °C por 48 h em incubadora orbital sob agitação de 100 rpm. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL da suspensão celular acidificada foram empregados no processo e após tratamento térmico a 55 °C os frascos foram aquecidos a 100 °C por 5 min., e foram resfriados a temperatura ambiente. O sobrenadante autolisado foi separado por centrifugação (8.000 rpm por 20 minutos a 4°C) (TAKALLOO et al., 2020).

4.1.2.4 Plasmólise

Uma suspensão da levedura (15% m/v) foi misturada com acetato de etila (1,5% v/v). Após boa homogeneização o pH da mistura foi ajustado para 5,5 e a plasmólise foi conduzida em incubadora orbital a 55 °C, 100 rpm por 48 h. A suspensão resultante foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 8000 x g por 20 min (TAKALLOO et al., 2020).

4.1.2.5 Hidrólise enzimática

Uma suspensão celular (200 mL) contendo 15% (m/v) com pH ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1 mol/L foi tratada com Alcalase (Novozymes) na proporção de 2 g de enzima liofilizada por kilograma de massa seca de levedura. A suspensão de levedura acrescida da enzima foi acondicionada em frascos Erlenmeyers de 250 mL (volume de trabalho 100 mL) os quais foram mantidos a 55 °C por 48 h sob agitação de 100 rpm. Após hidrólise o hidrolisado foi aquecido a 100 °C por 5 min. para inativação enzimática. O hidrolisado enzimático foi então separado por centrifugação (8.000 rpm por 20 minutos a 4°C) (TAKALLOO et al., 2019).

4.1.3 Avaliação da eficiência da lise

A eficiência de cada processo foi avaliada pelo conteúdo de sólidos solúveis totais e proteínas solúveis (método Kjeldahl) no extrato líquido lisado (autolisado, plasmolisado ou hidrolisado). Também foi monitorado o rompimento celular e liberação de material intracelular por análise de densidade ótica a 600 nm e leitura de absorvância em 260 e 280 nm.

4.1.4 Microrganismo e preparo do inóculo

O fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi utilizado no estudo. A cepa foi mantida em meio ágar Sabouraud-clorafenicol a 5°C com repiques periódicos.

Para o preparo do inóculo uma porção de micélio da cultura estoque foi transferida para meio ágar Sabouraud-cloranfenicol e cultivada em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 h. O micélio cultivado na placa foi transferido com auxílio de uma alça de inoculação para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio mineral Vogel (MMV) (VOGEL, 1956) e 10 mL de solução de glicose (50 g L⁻¹). O frasco foi mantido a 28 °C, 150 rpm por 48 h em incubadora orbital para o crescimento do fungo. As hifas da pré-cultura foram homogeneizadas assepticamente em um liquidificador para obtenção de uma

suspensão concentrada. A suspensão micelial foi diluída em solução salina estéril (0,9% p/v) para obtenção de uma suspensão de concentração padrão com leitura de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

4.1.5 Cultivo submerso para produção de β -glucana e biomassa micelial

Após a seleção do melhor protocolo de rompimento celular foram conduzidas fermentações para avaliar a influência das variáveis concentração do lisado celular (definido pelo conteúdo de proteína total) e suplementação com fonte de carbono (concentração de sacarose) sobre a produção da β -glucana extracelular e biomassa micelial. Para tanto foi utilizada metodologia de Planejamento Experimental, com o uso de um delineamento Fatorial Completo (2^2) com triplicada no ponto central, totalizando 7 ensaios conforme mostrado na Tabela 5. As respostas consideradas foram a produção de lasiodiplodana e biomassa micelial (P_P , P_X), rendimento ($Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$) em lasiodiplodana e biomassa micelial, e a produtividade volumétrica em lasiodiplodana (Q_P) e biomassa micelial (Q_X).

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial (2²)

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis	
	[Lisado Celular]	[Sacarose]
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Variáveis	Níveis Reais das Variáveis		
	-1	0	+1
[Lisado Celular] (g L ⁻¹)	1	4	7
[Sacarose] (g L ⁻¹)	5	32,5	60

[Lisado celular]: concentração de proteínas totais do lisado celular. [Sacarose]: concentração de sacarose.

Fonte: Autor (2021).

Além da avaliação da influência das variáveis estudadas (efeito principal e possível interação) o experimento descrito acima auxiliou na definição dos níveis mais adequados das variáveis que foram estudados em um segundo planejamento experimental.

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de meio formulado com o substrato residual (lisado celular) obtido da levedura cervejeira e suplementado com a fonte de carbono, seguindo as concentrações descritas nos respectivos planejamentos. Inóculo (10 mL) com concentração micelial padronizada foi adicionado aos meios de cultivo previamente preparados e os frascos foram incubados em incubadora orbital por 72 h a 28 °C de temperatura e agitação de 150 rpm. O pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 5,5 com solução HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹ (CUNHA et al., 2012).

Também foi avaliada a necessidade de suplementação mineral do meio de cultivo para a produção da lasiodiplodana e biomassa micelial. Para tanto, foram conduzidos ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyer de 250 mL

contendo 90 mL de meio e 10 mL de inóculo padronizado. Na formulação do meio foram empregadas as melhores concentrações de substrato residual (lisado celular) e fonte carbono, selecionadas e definidas no planejamento experimental. Foram avaliadas suplementações com K_2HPO_4 e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nas concentrações de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, 1 g L^{-1} e 2 g L^{-1} de cada sal. Os frascos foram incubados em incubadora orbital por 72 h a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura e agitação de 150 rpm. O pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 5,5 com solução HCl 1 mol L^{-1} ou NaOH 1 mol L^{-1} .

4.2 CARACTERIZAÇÕES ANALÍTICAS

A levedura residual foi caracterizada quanto aos conteúdos de proteína bruta, carboidratos totais, lipídios (extrato etéreo), fibra bruta e umidade, além da composição elementar (carbono e nitrogênio solúvel total). Os lisados celulares foram caracterizados quanto aos conteúdos de sólidos solúveis totais, componentes intracelulares solúveis, proteínas solúveis, carbono orgânico total, nitrogênio total e relação carbono / nitrogênio.

A biomassa micelal produzida nas condições otimizadas foi caracterizada quanto aos parâmetros: composição proximal (umidade, carboidratos totais, proteína bruta, lipídios, resíduo mineral fixo, fibra alimentar), e perfil de aminoácidos e lipídios.

4.2.1 Análise de Umidade

A umidade da amostra foi determinada em triplicata conforme descrição do método oficial AOAC 925.10, no qual 5 g de cada amostra foi seca em estufa com circulação de ar a 105°C até massa constant (LATIMER, 2016).

4.2.2 Lipídeos

A determinação dos lipídios totais foi realizada pelo método gravimétrico (Soxhlet) conforme descrito pelo método AOAC 920.39c. A extração da fração lipídica com solvente extrator de éter etílico foi realizada utilizando o equipamento tipo Soxhlet (extração por refluxo). Posterior a extração, o solvente

foi evaporado em uma placa quente e dessecador até uma massa constante da fração lipídica. O teor de lipídios foi obtido pela relação entre a massa da fração lipídica seca e a massa inicial da amostra (LATIMER, 2016).

4.2.3 Proteína bruta e nitrogênio orgânico total

Os teores de proteína bruta e nitrogênio orgânico total foram quantificados pelo método Kjeldahl descrito pelo método AOAC 2001.11 (LATIMER, 2016), que consiste na determinação do teor de nitrogênio total e posterior conversão em proteínas por meio de um fator de correção (6,25). O protocolo foi realizado em três etapas sucessivas: digestão, destilação e titulação. A digestão foi realizada em bloco digestor (450 °C) utilizando 0,2 g da amostra, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (PA) e uma mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro na proporção 0,3: 0,3: 6). Na etapa de destilação foram adicionados 20 ml de solução de hidróxido de sódio (40% m/v) e a amônia foi destilada em 10 ml de solução de ácido bórico (3%) na presença de um indicador vermelho de metila. O borato de amônia formado na etapa anterior foi titulado com solução normalizada de ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹) e o teor de proteína foi determinado pela seguinte equação:

$$Proteína\ total\ (\%) = V \times M \times 0,014 \times 6,25 \times 100$$

(1)

Em que:

- V= volume gasto de HCl;
- M= Molaridade do HCl;
- 0,014= Miliequivalente-grama do nitrogênio;
- 6,25= Fator de conversão geral do nitrogênio.

4.2.6 Resíduo mineral fixo

O resíduo mineral fixo foi determinado após as amostras serem incineradas em uma mufla a 550 °C, utilizando o método gravimétrico, conforme metodologia descrita por AOAC 923.03 (LATIMER, 2016).

4.2.7 Fibra alimentar e bruta

Para a determinação da fibra bruta, as amostras foram submetidas à digestão alcalina e ácida, e em seguida filtradas em cadinho Gocch, conforme descrito pela metodologia pelo protocolo 962.09 (AOAC, 2016). O conteúdo de fibra alimentar foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico 991.42 (LATIMER, 2016).

4.2.8 Carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos totais das amostras da levedura residual e da biomassa celular foi estimado por diferença entre 100 e a soma dos conteúdos de umidade, proteínas, lipídios e resíduo mineral.

4.2.10 pH

A medição do pH das amostras líquidas foi realizada diretamente em potenciômetro, em triplicata.

4.2.11 Determinação da eficiência do lise celular

Os teores de sólidos solúveis totais dos lisados celulares foram determinados por leitura direta em refratômetro portátil (LATIMER; HORWITZ, 2006). A disruptura celular após as lises celulares foi acompanhada por leituras de densidade ótica em 600 nm (células), bem como leituras em 260 nm (liberação de ácidos nucleicos) e 280 nm (proteínas). O conteúdo de proteínas solúveis nos lisados celulares foi estimada multiplicando os valores de conteúdo de nitrogênio total pelo fator de conversão 5,8.

4.2.12 Perfil de aminoácidos e composição lipídica

A determinação da composição de aminoácidos e lipídios da biomassa micelial foi realizada em um laboratório terceirizado, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (White; Hart; Fry, et al. 1986) e cromatografia gasosa seguindo o método oficial de análises nº. 996.06 of the Association of Analytical Chemists (AOAC International, 2016).

4.2.15 Determinação de carbono orgânico total (COT)

O protocolo recomendado pela Embrapa foi utilizado para determinar o teor de carbono orgânico total (COT) nos lisados celulares empregando o método úmido de dicromato de potássio (TEIXEIRA et al., 2017).

Porção de 0,1-0,2g de amostra liofilizada foi transferida para os tubos de digestão e, em seguida, foi adicionado 5 mL de dicromato de potássio e 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de digestão foram colocados no bloco de digestão pré-aquecido a 170 ° C por 30 minutos e, em seguida, resfriados por mais 15 minutos.

O conteúdo de cada tubo foi transferido para frascos erlenmeyers de 250 mL com volume de 80 mL com água destilada. Com a solução à temperatura ambiente, foi adicionada 0,3 mL da solução indicadora, o volume completado para 250 mL com água destilada, e posteriormente a mistura foi titulada com solução de sulfato ferroso amoniacal. O ponto de viragem foi a transição do verde para o violeta escuro, e o volume gasto na titulação foi anotado.

O carbono total da amostra foi determinado pela Equação 1.

$$C \frac{g}{kg} = (40 - vol. gasto na titulação) \times f \times 0,6 \text{ Equação 1.}$$

Onde:

$$f = \frac{40}{\text{volume de sulfatoferros o usado na prova dobranco}}$$

Equação 1.1

A proporção da matéria orgânica total foi calculada multiplicando o carbono orgânico total por 1,724, assumindo que a matéria orgânica representa aproximadamente 58% do carbono orgânico.

Portanto, a matéria orgânica total é determinada pela Equação 2.

$$M.O \frac{g}{Kg} = C \frac{g}{Kg} \times 1,724 \text{ Equação 2}$$

4.2.5 Quantificação do exopolissacarídeo (Lasiodiplodana) e biomassa micelial

O EPS ((1→6)-β-D-glucana, lasiodiplodana) foi separado do caldo fermentativo por precipitação em três volumes de etanol (95%) a 5 °C, overnight. O EPS precipitado foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante. Após seco, o EPS foi quantificado por gravimetria. A biomassa micelial recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1350 x g, 20 min.) foi suspendida e lavada com água quente (60 °C) e novamente centrifugada. Na sequência a biomassa micelial foi seca a 70 °C até massa constante e quantificada gravimetricamente.

4.2.16 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e análise de difratometria de raios-X

As amostras de lasiodiplodan produzidas foram analisadas por espectroscopia FT-IR e difratometria de raios X (DRX). Os espectros de FT-IR foram registrados usando um espectrômetro Frontier FT-IR (Perkin Elmer, EUA) com varreduras na região de 4000 a 400 cm⁻¹, com 32 acumulações, resolução de 4 cm⁻¹ e usando o método do disco KBr. Os padrões de difração de raios X foram registrados em um difratômetro Rigaku MiniFlex600 (CuKα = 1,5418 Å, corrente de 15 mA, tensão de 40 kV, faixa de varredura de 10° a 60° (2θ), velocidade de varredura de 5° min⁻¹ e largura de passo de 0,02° (2θ)).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1: Valorization of spent Brewers yeast in the integrated production of the fungal exopolysaccharide lasiodiplodan, (1→6)- β -D-glucan, and single-cell protein

Holdai Carlos Emerich Heringer^a, Marcelo Luis Kuhn Marchiolo^a, Daiane Meneguzzi^b, Aneli M. Barbosa-Dekker^c, Robert F. H. Dekker^c, Mario Antônio Alves da Cunha^{b, *}

^a Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná R, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brazil

^c Beta-Glucan Produtos Farmoquímicos-EIRELI, Lote 24^A - Bloco Zirconia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Avenida João Miguel Caram, 731, CEP: 86036-700, Londrina, Paraná, Brazil

ORCID NUMBERS:

Daiane Meneguzzi: 0000-0002-0449-6512. e-mail: daiameneguzzi@hotmail.com

Holdai Carlos Emerich Heringer: 0000-0001-5574-7804. e-mail: holdaicarlos@hotmail.com

Aneli M. Barbosa-Dekker: 0000-0002-2339-8985. e-mail: anelibarbosa@gmail.com

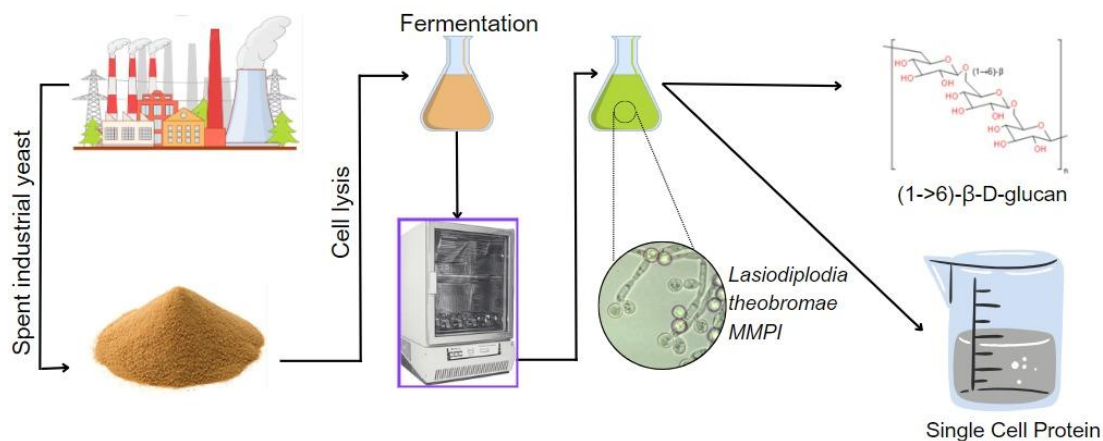
Robert F. H. Dekker: 0000-0002-3787-6917. e-mail: xylanase@gmail.com

Marcelo Luis Kuhn Marchioro: 0000-0003-2850-0413. e-mail: marchioro82@gmail.com

Mário Antônio Alves da Cunha: 0000-0002-1589-7311. e-mail: mcunha@utfpr.edu.br

* **Corresponding author:** Dr. Mário A. A. Cunha. E-mail address: mcunha@utfpr.edu.br

GRAPHICAL ABSTRACT

**ABSTRACT**

Spent brewer's yeast was studied as a low-cost alternative feedstock for sustainably producing a high added-value microbial β -D-glucan (lasiodiplodan). The potential of using the mycelial biomass (single cell-protein) generated in the production of β -glucan was also evaluated as a strategy of integrated biorefining. Five cell lysis protocols were studied to obtain a yeast cell lysate rich in nutrients. Mineral supplementation of the fermentation medium was assessed, and the single-cell protein (SCP) produced was characterized by the nutritional composition, amino acid, and lipid profiles. *Lasiodiplodia theobromae* MMPI was effective in the co-production of lasiodiplodan ((1 \rightarrow 6)- β -D-glucan)) and SCP in a cell lysate-based medium. Enzymatic hydrolysis with Alcalase promoted more significant cell rupture and release of soluble intracellular components. Mycelial biomass obtained was rich in protein and contained all essential amino acids with high concentrations of leucine, lysine, valine, and threonine. Co-production of lasiodiplodan and SCP could be an economically promising bioprospecting alternative.

KEYWORDS: cell lysis; exopolysaccharide; fungal protein; lasiodiplodan; *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

1. Introduction

Carbohydrates obtained from plants rich in sugars or starch are still the major inputs used in the biotechnological production of chemical products of interest. However, the food and animal feedstuff industries' competitive use of these raw materials represents a dilemma. The search for alternative carbon sources has gained importance in industrial biotechnology (Keller et al., 2020), and the valorization of residual biomass is strategic for reducing production costs and environmental issues.

Among the different kinds of biomass generated as process by-products is Brewers yeast, which deserves attention due to its nutritional quality and large industrial production (Kerby and Vriesekoop, 2017). Biotechnological products with high added-value can be produced from the residual biomass of brewing yeasts. In this context, residual yeast biomass has a high dry-mass carbon content (45-47%), crude protein (15% to 49%), minerals, and vitamins (2% to 7%) (Rachwał et al., 2020).

Among the products obtained by biotechnological processes, polysaccharides (carbohydrate biopolymers) are part of an emerging and growing market. The global market of polysaccharides and oligosaccharides is estimated to grow more than 5% from 2020 to 2030, and movement of more than 22 billion dollars (FACT.MR, 2021).

Some polysaccharides have biological and technological properties, especially the β -glucans. These biomacromolecules are commonly extracted from the cell wall of yeasts, or cereals such as oats and barley, in processes that typically involve the use of cold and hot water, organic solvents, acids and alkalis. Some β -glucans have been described in the literature as extracellular polysaccharides (described as exopolysaccharides, EPS) produced by microorganisms under submerged fermentation conditions. For example, the β -glucan lasiodiplodan, an uncommon exopolysaccharide produced by several strains of the ascomycete *Lasiodiplodia theobromae*, consists of an unbranched $\beta(1\rightarrow6)$ -linked backbone chain comprising monomeric D-glucose repeat residues (Abdeshahian et al., 2020; Vasconcelos et al., 2008), and has a molecular mass reported to be 1.8×10^6 Daltons (Oliveira et al., 2015). Lasiodiplodan has demonstrated some

biological properties such as antiproliferative, hypocholesterolemic, hypoglycemic, antioxidant, antimicrobial activity and reduction of transaminase activity in rats (Calegari et al., 2019).

The recovery and purification of exopolysaccharides is much simpler and more economical compared to the extraction of polysaccharides from the biological cell wall materials; it involves simple operations such as recovery (filtration), precipitation with alcohol, and does not require using aggressive chemicals that can lead to the damage of their chemical structures (Corradi da Silva et al., 2008), nor is a cleanup required of waste materials generated by the extraction processes.

Another group of bioproducts with market potential and promising prospects are proteins of microbial origin, also known as Single Cell Proteins, which are protein-rich biomass produced by bacteria, yeast, fungi, and algae (Zhang et al., 2023). The steady growth of the global population, along with significant socio-demographic changes, is expected to intensify the demand on the world's resources, particularly in the realm of food production. This heightened pressure necessitates the provision of larger quantities and diverse varieties of foods to meet the evolving needs of humanity (Henchion et al., 2017). The global demand for protein is growing, and part of this demand could be met using biomass and renewable organic resources. In this sense, unicellular proteins have aroused the interest of researchers all over the world, whose production is carried out by bacteria, fungi and algae.

In 2020, the global unicellular protein market value reached 5.6 billion USD and is estimated to grow by 5.3% by 2027 (360 Market Updates, 2023). Part of the driving force for this growth is due to people's awareness of the environmental advantages of its production and health issues of this protein, as well as the increase in protein consumption.

Cellular protein production has some advantages over animal and plant derived proteins, as its production does not require extensive areas of land for cultivation or large reservoirs for storage, and output is not seasonally affected by climate, nor does it contribute to the release of gases that contribute to global warming as in the production of protein using live animals (Natani Lupatini et al., 2013; Tian et al., 2023).

The study reported herein evaluates the biomass of spent Brewers yeast as a low-cost substrate for the integrated production of microbial exocellular β -glucan and single-cell protein (SCP). The performance of five cell lysis protocols was first studied to find the optimal condition of obtaining a yeast cell-lyzate rich in nutrients to be used as a substrate in the fungal production of the β -glucan, lasiodiplodan, and mycelial biomass. The supplementation of the culture medium with mineral salts was also studied under submerged fermentation conditions, and the SCP produced was characterized in terms of nutritional composition and the profile of amino acids and lipids present. An efficient integrative biorefinery process was proposed for the co-production of high added-value microbial β -glucan and SCP by the ascomyceteous fungus, *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Proximal composition analysis of spent Brewers yeast

The proximal composition was validated by the Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC, 2016): crude protein - Kjeldahl method (method 979.09); lipids - Soxhlet extraction (method 945.38); mineral residue - incineration at 550 °C (method 923.03); dietary fiber - enzymatic gravimetric method (method 985.29). Humidity was estimated after drying at 105 °C. The total carbohydrate content was determined by the difference between 100 and the sum of the content of water, proteins, lipids and mineral residues. The energy value of the product developed was estimated following the Atwater conversion factors (proteins: 4 kcal g⁻¹, carbohydrates: 4 kcal g⁻¹ and lipids: 9 kcal g⁻¹) (Lasta et al., 2021).

2.2. Methods used to lyse spent Brewers yeast

2.2.1. Preparation of spent Brewers yeast

The spent Brewers yeast sample was obtained from a microbrewery in the city of Pato Branco, Paraná (Brazil), and was kept frozen at -18 °C until use. The

spent yeast was first washed with water and centrifuged to remove residues that may have appeared during the process of beer making. The protocol followed was that described by Jacob, Hutzler, *et al.*, (2019). The spent yeast was dispersed in distilled water (10% w dry matter /v) and the suspension stirred (150 rpm in orbital incubator at 25 °C) for 5 min and then centrifuged ($1350 \times g$ 5 min⁻¹). The supernatant was discarded, and the sedimented yeast pellet obtained was dispersed in distilled water (10% dry matter) and the procedure repeated. Finally, the washed and centrifuged yeast biomass was suspended in water (15% w/v), and kept under refrigeration (5 °C) until needed, and was used to evaluate the different procedures for the lysis of the spent yeast cells (see below).

2.2.1.1. Cell lysis by heat treatment

To obtain the lyzed extract by the autoclaving process, the protocol described by Zarei, Dastmalchi, *et al.*, (2016) was followed. The washed yeast cell suspension was prepared by dispersing 500 g of cell biomass solution in 2 L of deionized water (milli-Q). The suspension was autoclaved at 115 °C for 10 min, followed by rapid cooling in an ice bath. Cell debris was separated by centrifugation at $10,000 \times g$ at 4 °C for 10 min.

2.2.1.2. Autolysis

Autolysis was conducted in medium containing NaCl and ethyl acetate. In a volume of 200 mL of cell suspension (15% w/v), NaCl (0.086 mol L^{-1}) and ethyl acetate (0.051 mol L^{-1}) were added, and the pH was adjusted to 6.5. The suspension was heated at 50 °C for 24 h under constant agitation (100 rpm). After autolysis, the suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatant collected served as the autolyzate (Jacob *et al.*, 2019).

2.2.1.3. Cell lysis by acid hydrolysis

The pH of the yeast cell suspension (15% w/v) was adjusted to 5.50 with HCl (1 mol L⁻¹) and the resultant solution was heated at 55 °C for 48 h in an orbital incubator under constant agitation (100 rpm) (Takaloo et al., 2020). After the thermal treatment at 55 °C, the acidified yeast suspension was heated at 100 °C for 5 min., and then cooled to room temperature. The autolyzed supernatant was separated by centrifugation (10,000 x g) for 20 min at 4 °C.

2.2.1.4. Plasmolysis

A yeast suspension (15% w/v) was mixed with ethyl acetate (1.5% v/v). After homogenization, the pH of the mixture was adjusted to 5.50, and plasmolysis was carried out at 55 °C for 48 h in an orbital incubator (100 rpm) (Takaloo et al., 2020). The resulting suspension was heated at 100 °C for 5 min, and the supernatant separated by centrifugation at 10,000 x g for 20 min.

2.2.1.5. Cell lysis by enzyme hydrolysis

A 15% (w/v) cell suspension of spent Brewers yeast (200 mL) with pH adjusted to 7.00 with sodium hydroxide (1 mol L⁻¹) was treated with the enzyme preparation Alcalase 2.4 L FG (Novozyme, Araucária, PR, Brazil) using 2 g of enzyme per kg of dry yeast biomass (Takaloo et al., 2020). The yeast suspension with the added enzyme was placed in 250 mL Erlenmeyer flasks (working volume 100 mL) and was kept at 55 °C for 48 h under agitation (100 rpm). After the enzyme hydrolysis step, the hydrolyzate was heated at 100 °C for 5 min to terminate the reaction. The enzymatic hydrolyzate was then centrifugation (10,000 g for 20 min at 4 °C), and the supernatant containing the lyzed yeast recovered.

2.2.2. Efficiency of cell lysis

The efficiency of each lysis procedural step was evaluated by the content of total soluble solids and soluble proteins in the lyzed liquid extracts obtained (autolyzed, plasmolyzed or enzymatically hydrolyzed). Cell disruption and

release of intracellular material was also monitored by optical density measurement at 600 nm and absorbance readings at 260 and 280 nm.

2.2.3. *Microorganism and inoculum preparation*

The ascomyceteous fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI was used in this study. The strain was maintained on Sabouraud-chloramphenicol agar medium at 5 °C with periodical sub-culturing.

To prepare the inoculum, a portion of the mycelium from the stock culture was transferred to Sabouraud-chloramphenicol-agar medium and cultivated in a bacteriological oven at 28 °C for 96 h. The mycelium grown on the plates was transferred using an inoculation loop to a 250-mL Erlenmeyer flask containing 90 mL of Vogel minimum salts medium (VMSM; Vogel, 1956) and 10 mL of glucose solution (50 g L⁻¹). The flasks were kept at 28 °C for 48 h (150 rpm), and then the contents were aseptically homogenized in a blender to obtain a homogeneous suspension. The mycelial suspension was diluted in sterile saline solution (0.9% w/v) to obtain a standard suspension with an absorbance reading between 0.4 and 0.5 at 400 nm (Steluti et al., 2004).

2.2.4. *Submerged cultivation for the production of β -glucan and mycelial biomass*

Fermentations were carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks, containing 90 mL of medium formulated with the pre-selected substrate (enzymatic hydrolyzate, see item 3.2) obtained from Brewers yeast and supplemented with sucrose as a carbon source. The fermentations runs were carried out following a Complete Factorial Design (2²) with triplicates at the central point, which totaled 7 experimental runs according to Table 3. The contents of sucrose as substrate, and total protein content in the enzymatic lyzate, were the independent variables, while the contents of mycelial biomass and lasiodiplodan produced were the dependent variables.

Inoculum (10 mL) with standardized mycelial concentration was added to the above-mentioned culture media, and the flasks incubated in an orbital incubator

for 72 h at 28 °C and agitation (150 rpm). The initial pH of the culture media was adjusted to 5.50 with 1 mol L⁻¹ HCl or 1 mol L⁻¹ NaOH solution (Cunha et al., 2012).

After defining the best concentrations of sucrose and total protein content, the need for mineral supplementation of the culture medium was examined for the production of lasiodiplodan and mycelial biomass. For this purpose, fermentation runs were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 90 mL of culture medium and 10 mL of standardized inoculum (28 °C, 72 h, 150 rpm). Supplementations with K₂HPO₄ and MgSO₄·7H₂O were evaluated at concentrations of 0.5 g L⁻¹, 1.0 g L⁻¹ and 2.0 g L⁻¹ for each salt.

2.2.5. Lasiodiplodan and biomass recovery

Following fungal cultivation, the samples were filtered and subsequently washed with water and filtered again. The residue retained on the filter, which represents the fungal mycelium (biomass), was dried in an oven at 70 °C until constant mass, weighed and recorded as P_x. The filtrate, which contains lasiodiplodan, was precipitated from solution with absol. ethanol (4 vols.), and the mixture left for 24 h at 4 °C. After this period, the lasiodiplodan precipitate was collected by filtration and dried in an oven at 70 °C until constant mass, weighed and recorded as P_p.

2.3. FT-IR spectroscopy and X-ray diffractometry analysis

The samples of lasiodiplodan produced were analyzed by FT-IR spectroscopy and X-ray diffractometry (DRX). FT-IR spectra were recorded using a Frontier FT-IR spectrometer (Perkin Elmer, USA) with scans in the region of 4000 to 400 cm⁻¹, with 32 accumulations, resolution of 4 cm⁻¹, and using the KBr disc method. X-ray diffraction patterns were recorded on a Rigaku MiniFlex600 diffractometer (CuKα = 1.5418 Å, 15 mA current, 40 kV voltage, scanning range of 10° to 60° (2θ), 5° min⁻¹ scanning speed and step width of 0.02° (2θ)).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Proximal composition of spent brewing yeast biomass

The spent Brewers yeast biomass showed relatively high contents of crude protein ($53.94 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), organic nitrogen ($9.30 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), total carbohydrates ($31.00 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and organic carbon ($42.90 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) (see Table 1). Bertolo et al., (2019) and Wan et al., (2021) also reported high amounts of protein and carbohydrate material; 42.83% and 38.72%, respectively, in yeast from beer, and berry fruit wine brewing. Our spent brewing yeast also proved to be rich source of minerals ($4.70 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), which varies considerably depending on the strain and origin of the yeast. In this context, lower mineral contents were reported by Bertolo et al., (2019) ($1.74 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and Wan et al., (2021) ($1.83 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Likewise, the lipid content also varies as a function of the yeast biomass evaluated. For instance, Wan et al., (2021) reported a total lipid content of $6.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in yeast biomass, which is in close proximity to our finding ($5.34 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), while the yeast arising from the berry fruit vinification process resulted in a much lower value ($1.45 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$; Bertolo et al., 2019).

Table 1.

Proximal composition of freeze-dried spent Brewer's yeast.

Composition	Results ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)*		
	This study	(Bertolo et al., 2019)	(Wan et al., 2021)
Moisture	5.02 ± 0.25	0.07 ± 0.00	-
Crude protein**	53.94 ± 1.32	42.83 ± 0.11	38.72 ± 0.64
Ether extract	5.34 ± 0.08	1.45 ± 0.040	6.50 ± 1.32
Mineral residue (ash)	4.70 ± 0.15	1.74 ± 0.17	1.83 ± 0.41
Carbohydrates#	31.00 ± 0.93	53.91	35.46 ± 0.47
Raw fiber	5.41 ± 0.09	-	-
Total organic carbon	42.90 ± 0.98	-	-
Total nitrogen	9.30 ± 0.25	-	-

* Results expressed as the means \pm standard deviation; ** Nitrogen content x 5.8; # the carbohydrate content was determined by difference, and disregarding the raw fiber content in the calculation.

3.2. Efficiency of yeast cell lysis

Cell lysis is a unit operation designed to disrupt the cellular membrane and wall releasing the intracellular contents (cytosol). This process is essential for extracting intracellular components, including valuable protein materials. Different cell disruption methods have been employed to obtain cell lysates, and cell lysis can be classified as complete or partial (Islam et al., 2017). The method chosen to disrupt the yeast significantly influences the release of intracellular content and, consequently, the composition of the yeast extract (Jacob et al., 2019).

In this work, heat treatment, autolysis, acid hydrolysis, plasmolysis, and enzyme hydrolysis techniques were used to release intracellular material from spent Brewers yeast. In heat treatment the use of high temperature leads to the denaturation of membrane proteins, causing damage to the cell membrane and resulting in the release of intracellular material. This process liberates a substantial amount of protein (Islam et al., 2017).

In the autolytic process, the release of intracellular material depends on the action of the yeast's enzymes or is supported by salts, solvents, or the addition of enzymes to achieve the highest possible extract yield (Jacob et al., 2019). Acid hydrolysis is a non-mechanical chemical treatment (Zainuddin et al., 2021) where acids have solvent properties that promote cell membrane destruction. The acid-base properties of membrane lipids directly influences their response to pH changes (Angelova et al., 2018).

Plasmolysis entails the application of a cell membrane-disrupting agent (such as ethyl acetate, toluene, or ethanol) to yeast cells. This disrupts the integrity of the lipid bilayer and significantly enhances the permeability of the cell membrane, allowing for the complete release of cell contents into the external medium (Tao et al., 2023). Finally, enzymatic hydrolysis is one of the methods with some advantages such as rapid degradation rate of the cell membrane, obtaining an

amount of more soluble substances after hydrolysis; the extract obtained has a high polypeptide content and low salt content and a slight odor. In enzymatic hydrolysis, enzymes digest the cell wall proteins, leading the cell to osmotic shock or precipitating out the cell wall proteins (Tao et al., 2023).

Absorbance at 260 and 280 nm were recorded to measure cell disruption and leakage of soluble intracellular component out of the cell (in particular peptides and proteins (A_{280}), nucleic acids and nucleotides (A_{260})). The optical density at 600 nm (OD_{600}) shows the amount of intact yeast cells after each of the lysis steps that remained in the yeast-treated samples (Fig. 1). The cell lysis condition that promoted greater cell rupture was enzymatic hydrolysis using Alcalase® 2.4 LFG. Under the hydrolysis condition, the lowest OD_{600} value was 0.341. Similar OD_{600} values were found in autolysis in acid medium (0.362), indicating that similar amounts of cells remained intact after enzymatic and acid lysis procedures. On the other hand, enzymatic hydrolysis promoted higher release of soluble intracellular components (SIC; 46.29 g 100 g⁻¹), as well as leading to an extract containing a higher content of soluble proteins (65.80 g 100 g⁻¹). Heat treatment was the least effective cell lysis condition for yeast cell disruption (OD_{600} : 0.515).

Evaluation by monitoring A_{260} (Fig. 1B) and A_{280} (Fig. 1C) revealed that thermal autolysis and (NaCl + ethyl acetate) autolysis promoted less cell disruption and less release of cellular contents. The best cell rupture results, as analyzed by absorbance readings at 260 nm and 280 nm, were obtained for enzymatic hydrolysis, acid autolysis and plasmolysis, with no significant statistical difference ($p < 0.05$) between them.

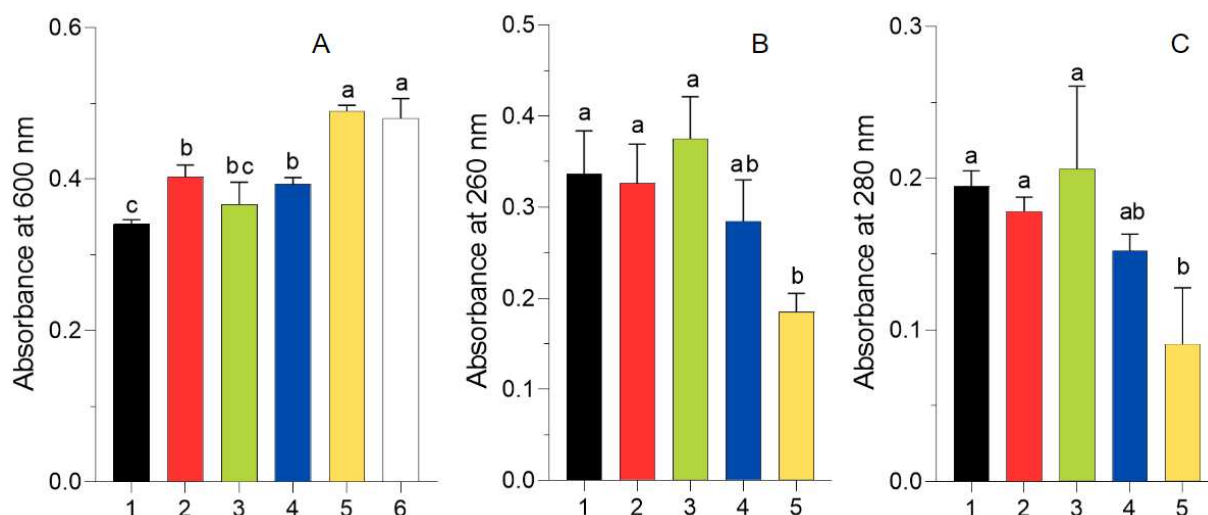


Fig. 1. Monitoring cell lysis and the release of intracellular contents. Optical density at 600 nm (A), and the absorbances at 260 nm (B) and 280 nm (C) of the lysed samples: 1 - Enzymatic hydrolysis, 2 - Plasmolysis (ethyl acetate), 3 - Autolysis in acid medium, 4 - Autolysis with NaCl and ethyl acetate, 5 - Heat treatment, and 6 - No treatment. The same letters do not show significant differences according to Tukey's test at 5% possibility ($p < 0.05$).

Table 2 shows the contents of soluble intracellular components (SIC), total soluble solids (TSS), soluble proteins (SP), total nitrogen and organic carbon found in the cellular lysates. The analysis of the contents of TSS, SIC and SP revealed that enzymatic hydrolysis with Alcalase[®] promoted greater cell disruption and resulted in an extract richer in soluble intracellular components and proteins. This lysis condition resulted in a cell lysate containing 46.29 g 100 g⁻¹ of soluble intracellular contents of which the soluble protein content was 65.80g 100 g⁻¹. A higher extraction yield of soluble intracellular components (SIC: 65.8 g 100 g⁻¹) was reported by Takaloo et al., (2020) using similar enzymatic hydrolysis conditions but of Baker's yeast. However, they found a somewhat lower content of soluble proteins in the cell lysate (48.8 g 100 g⁻¹). The cell lysates obtained in our study were found to be rich in carbon and nitrogen, regardless of the treatment used for cell disruption. The results suggest that such lysates are excellent sources of carbon and nitrogen for the formulation of microbial culture media, contributing to the utilization of spent Brewers yeast.

Tabela 4.

Comparison of soluble solids, soluble intracellular material, protein material and organic carbon contents between cell lysis protocols.

Description	Autolysis			Plasmolysis	Enzymatic hydrolysis
	<i>Acid - pH 5.5</i>	<i>NaCl + EtOAc</i>	<i>Thermic</i>	<i>EtOAc</i>	<i>Alcalase</i>
TSS (°BRIX)	11.00 ^c ± 0.00	12.00 ^b ± 0.00	5.00 ^e ± 0.00	10.50 ^d ± 0.00	12.50 ^a ± 0.00
SIC (g 100 g ⁻¹)	36.00 ^c ± 0.05	44.01 ^b ± 0.10	13.90 ^e ± 0.03	35.01 ^d ± 0.20	46.29 ^a ± 0.30
Soluble protein (g 100 g ⁻¹) (N x 5.8)	58.93 ^c ± 0.23	60.12 ^{bc} ± 0.20	60.2 ^{bc} ± 0.12	63.08 ^{ab} ± 0.15	65.80 ^a ± 0.32
SIC x Soluble Protein	21.21	26.46	8.37	22.08	30.45
Total nitrogen (g 100 g ⁻¹)	10.16 ^d ± 0.04	10.36 ^{cd} ± 0.04	10.38 ^c ± 0.02	10.90 ^b ± 0.03	11.35 ^a ± 0.06
Total organic carbon (g 100 g ⁻¹)	35.86 ^{ab} ± 0.84	32.18 ^c ± 0.22	33.48 ^{bc} ± 0.08	34.75 ^{abc} ± 0.75	37.58 ^a ± 0.28
Ratio C / N	3.60	3.11	3.21	3.12	3.27

* Results expressed as mean and standard deviation

TSS: total soluble solids content, SIC: Soluble intracellular componente, SP: Soluble protein in cell lysate

3.3. Influence of sucrose and total protein contents of the cultivation medium on production, yield, and volumetric productivity of β -glucan (lasiodiplodan) and mycelial biomass

Table 3 shows the results regarding production, yield and volumetric productivity in lasiodiplodan and mycelial biomass according to the experimental runs based on a 2^2 full factorial design. Lasiodiplodan production (P_P) ranged from 0.63 g L^{-1} (run 1) to 2.12 g L^{-1} (run 4). Likewise, the highest production of mycelial biomass was observed in run 4 (9.95 g L^{-1}), and the lowest production in run 1 (1.85 g L^{-1}).

In run 4, the best production of lasiodiplodan (2.12 g L^{-1}) and mycelial biomass (9.95 g L^{-1}) were found with 60 g L^{-1} of sucrose added, and 7 g L^{-1} of protein from the cell lyzate obtained by enzyme hydrolysis. The results are close to that obtained by Cunha et al., (2012); values of 2.46 g L^{-1} lasiodiplodan and 11.26 g L^{-1} biomass when using glucose and yeast extract as the respective carbon and nitrogen sources.

Table 2.

Results of the experimental statistical design for the production, yield, and volumetric productivity of lasiodiplodan and mycelial biomass.

Runs	Variables (coded levels)		Observed responses					
	X ₁	X ₂	P _P (g L ⁻¹)	P _X (g L ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Q _X (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	-1	-1	0.63 ^f ± 0.02	1.85 ^e ± 0.02	0.13 ^b	0.37 ^b	0.009 ^g	0.026 ^f
2	+1	-1	1.00 ^e ± 0.02	5.91 ^d ± 0.00	0.02 ^e	0.10 ^e	0.014 ^f	0.082 ^e
3	-1	+1	1.06 ^e ± 0.04	6.50 ^c ± 0.00	0.21 ^a	1.30 ^a	0.015 ^e	0.090 ^d
4	+1	+1	2.12 ^a ± 0.01	9.95 ^a ± 0.00	0.04 ^d	0.17 ^d	0.029 ^a	0.138 ^a
5	0	0	1.46 ^d ± 0.03	7.20 ^b ± 0.02	0.05 ^c	0.22 ^c	0.020 ^d	0.100 ^c
6	0	0	1.60 ^c ± 0.02	7.10 ^b ± 0.02	0.05 ^c	0.22 ^c	0.022 ^c	0.099 ^c
7	0	0	1.71 ^b ± 0.05	7.39 ^b ± 0.04	0.05 ^c	0.23 ^c	0.024 ^b	0.116 ^b

Factors	Real values		
	-1	0	+1
X ₁ (total protein, g L ⁻¹)	1	4	7
X ₂ (sucrose, g L ⁻¹)	5	32.5	60

* Results expressed as mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate statistical significant difference ($p < 0.05$) by Turkey's test. X₁: total protein concentration derived from cell lyzate. X₂: sucrose concentration in the cultivation medium.

P_P: lasiodiplodan production; P_X: mycelial biomass production; Y_{P/S}: yield in lasiodiplodan; Y_{X/S}: yield in mycelial biomass; Q_P: volumetric productivity in lasiodiplodan; Q_X: volumetric productivity in mycelial biomass.

To give a better visualization of the effects of the variables studied on the responses obtained, Pareto charts and response surface 3D plots and contours were plotted as shown in the respective Fig. 2 and Fig. 3.

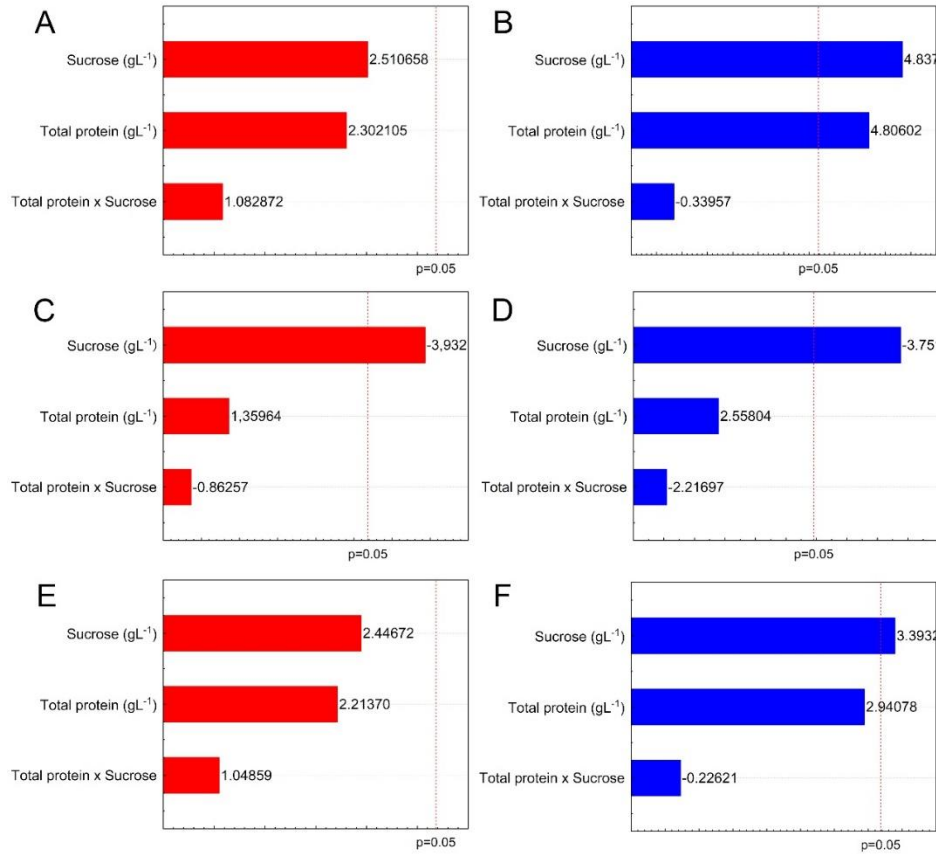


Fig. 2.

Pareto charts of the standardized effects for the production, yield, and volumetric productivity on lasiodiplodan and mycelial biomass. The effects of sucrose and total protein concentrations on the production of lasiodiplodan (Fig. 2A) and mycelial biomass (Fig. 2B), the yields of lasiodiplodan (Fig. 2C) and mycelial biomass (Fig. 2D), and the volumetric productivity in lasiodiplodan (Fig. 2E) and mycelial biomass (Fig. 2F).

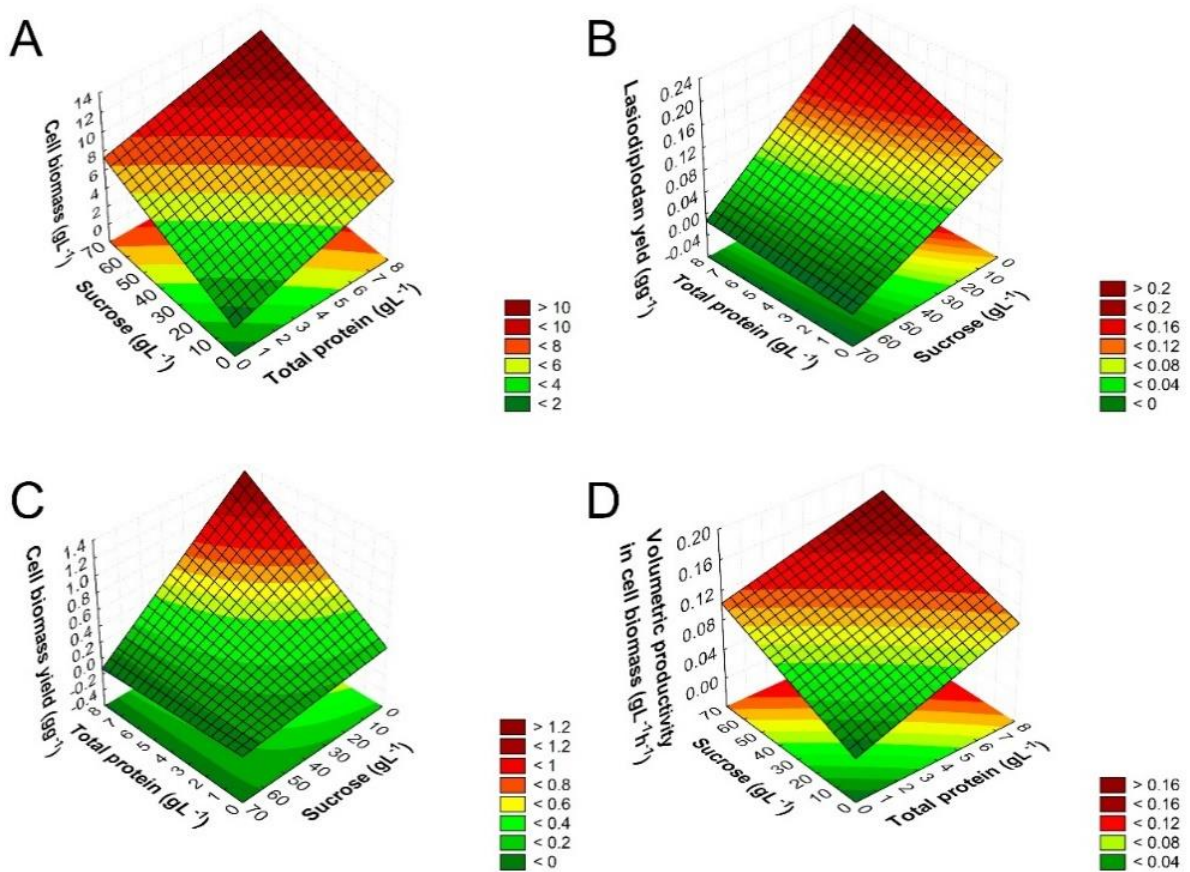


Fig. 3.

3D response surface and contour plots showing the effects of sucrose and total protein concentrations on mycelial biomass production (Fig. 3A), yield of lasiodiplodan (Fig. 3B) and mycelial biomass (Fig. 3C), and volumetric productivity in mycelial biomass (Fig. 3D).

As shown in Fig. 2A and Fig. 2B, sucrose and total protein concentrations showed a statistically positive influence at the 95% confidence level ($p < 0.05$) on mycelial growth. The positive effect of these variables on the mycelial growth response showed that higher concentrations of carbon and nitrogen sources contributed to greater fungal growth, although a direct correlation with lasiodiplodan production was not found (Fig. 2A).

On the other hand, a statistically negative effect ($p < 0.05$) was verified for lasiodiplodan yield and mycelial biomass. This phenomenon indicated that higher concentrations of substrate (carbon and nitrogen sources) contributed to greater fungal

growth, but did not contribute to better conversion of the assimilated substrates into lasiodiplodan and mycelial biomass production.

Fig. 3F shows that only the sucrose concentration variable had a statistically positive effect ($p < 0.05$) on volumetric productivity of mycelial biomass. This indicates that the increase in sucrose concentration contributed to promoting greater fungal cell growth. It is also important to highlight that there were no statistically significant interaction effects ($p < 0.05$) between the separate variables of sucrose and total protein concentration.

The fermentation condition that promoted the highest production of lasiodiplodan and mycelial biomass (run 4: 60 g of sucrose and 7 g of cell lyzate) according to the 2² Full Factorial Design was chosen as a reference to evaluate the predictive potential of the model statistics obtained from the experimental design.

Analysis of variance (ANOVA) of the experimental design data showed that the representative mathematical model of mycelial growth (mycelial biomass production) was significant at a 95% confidence interval ($p < 0.05$). The F test indicated that the model is predictive (calculated $F >$ tabulated F), with a coefficient of determination (R^2) of 0.9318 and adjusted R^2 of 0.8636 (R-adjusted).

The experimental data were analyzed by multiple linear regression, and the mathematical model that represents the mycelial growth (mycelial biomass production) is displayed in Equation 1, in which only the significant variables were considered.

$$(P_X) = 1.246006 + 0.086394 X_1 + 0.685909 X_2 \quad \text{Equation 1}$$

To validate the representative mathematical model of mycelial growth, the mean values obtained in an experimental test using concentrations of sucrose and total protein similar to run 4 of the experimental design were correlated with the value predicted by the mathematical model obtained from the response surface (Fig. 3B).

The average mycelial biomass production verified in the experimental validation test was 10.48 g L⁻¹, which approximates closely to the mathematical model value of 11.23 g L⁻¹. Thus, the recovery of the average values of mycelial biomass production about the value predicted by the model was 93.3%. The high recovery value of the experimental data on the predictive model indicated adequate adjustment of the experimental data with the obtained mathematical model, especially in the case of a biological experiment.

Table 4 describes the results of the production of lasiodiplodan (P_P) and mycelial biomass (P_X), the yield in lasiodiplodan ($Y_{P/S}$) and mycelial biomass ($Y_{P/X}$), and volumetric productivities of lasiodiplodan (Q_P) and mycelial biomass (Q_X) verified in tests to evaluate mineral supplementation.

Mineral supplementation promoted an increase in the production of lasiodiplodan (P_P), with no need to use high concentrations of mineral salts as there was no significant difference in the results obtained using 0.5 g L^{-1} or 2 g L^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and K_2HPO_4 . In this way, the use of 60 g L^{-1} sucrose associated with 7 g L^{-1} total proteins (cell lyzate) and 0.5 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.5 g L^{-1} K_2HPO_4 was considered the best nutritional condition for the cultivation of the fungus *L. theobromae* MMPI.

Table 3.

Evaluation of mineral salts supplementation. The fungus was cultivated on sucrose (60 g.L⁻¹) and cell lyzate (total protein 7 g.L⁻¹) and supplemented with mineral salts.

Runs	MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	P _P (g L ⁻¹)	P _X (g L ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Q _X (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	0	0	1.61 ^b ± 0.08	10.84 ^b ± 0.15	0.027 ^b	0.181 ^b	0.022 ^d	0.150 ^c
2	0	0	1.60 ^b ± 0.12	10.11 ^c ± 0.31	0.027 ^b	0.168 ^c	0.019 ^e	0.140 ^d
3	0.5	0.5	1.91 ^a ± 0.04	10.14 ^{bc} ± 0.52	0.032 ^a	0.169 ^c	0.026 ^c	0.141 ^d
4	0.5	0.5	2.01 ^a ± 0.04	10.03 ^c ± 0.08	0.034 ^a	0.167 ^c	0.028 ^a	0.139 ^d
5	2	2	2.02 ^a ± 0.14	11.48 ^a ± 0.21	0.034 ^a	0.191 ^a	0.028 ^a	0.159 ^a
6	2	2	1.93 ^a ± 0.04	11.00 ^{ab} ± 0.21	0.033 ^a	0.183 ^b	0.027 ^a	0.153 ^b

Results are expressed as mean ± standard deviation. Equal letters in the same column do not differ statistically ($p < 0.05$) by Turkey's test.

P_P: lasiodiplodan production; P_X: mycelial biomass production; Y_{P/S}: yield in lasiodiplodan; Y_{X/S}: yield in mycelial biomass; Q_P: volumetric productivity in lasiodiplodan; Q_X: volumetric productivity in mycelial biomass.

The kinetic profile of the fungus *L. theobromae* MMPI cultivated under the culture conditions described above is shown in Fig. 4.

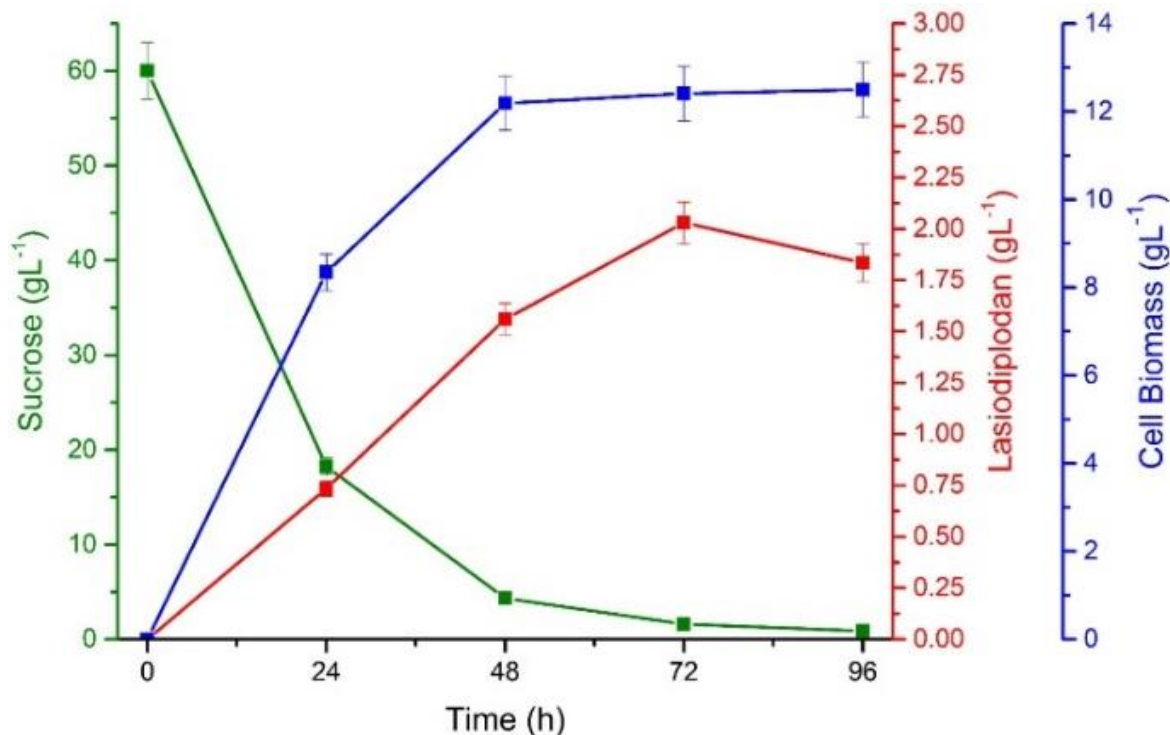


Fig. 4.

Fermentation profile of the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI in a medium containing sucrose (60 g L⁻¹), cell lyzate (7 g L⁻¹ total protein), MgSO₄·7H₂O (0.5 g L⁻¹) and K₂HPO₄ (0.5 g L⁻¹)

L. theobromae MMPI was able to consume the substrate (assimilated sugar) with assimilation of 69.1% observed within the first 24 h of cultivation. Similarly, high mycelial growth (8.34 g L⁻¹) and accumulation of lasiodiplodan in the medium (0.73 g L⁻¹) were observed during 24 h of cultivation. At 48 h of cultivation, around 93% of the substrate had been consumed, resulting in the production of 1.56 g L⁻¹ of lasiodiplodan and 12.19 g L⁻¹ of mycelial biomass. The maximum production of lasiodiplodan (2.03 g L⁻¹) was observed in 72 h of cultivation when there was an accumulation of mycelial biomass of 12.41 g L⁻¹. Higher amounts of lasiodiplodan (\cong 5.5 g L⁻¹) and mycelial growth (\cong 11.9 g L⁻¹) were previously reported for the fungus *L. theobromae* MMPI cultivated in a stirred-tank bioreactor on nutrient medium containing Vogel minimum salts synthetic medium (VMSM) and glucose as the carbon source, which was an

excellent substrate for cultivating the fungus (Cunha et al., 2012). It is important to emphasize that VMSM is a very rich mineral medium that contains vitamins and various nutrients that contribute to cell growth (Vogel, 1956). On the other hand, a 47.8% lower content of lasiodiplodan was reported by Acosta et al., (2020) in a culture medium based on soybean molasses supplemented with yeast extract (2 g L⁻¹), dibasic potassium phosphate (2 g L⁻¹) and magnesium sulfate·MgSO₄·7H₂O (2 g L⁻¹). Abdeshahian et al. (2020) reported production values of an extracellular polysaccharide by the *L. theobromae* strain CCT 3966 in batch fermentation ranging from 0.12 to 3.29 g L⁻¹. Comparing the data obtained with the scientific literature, it is evident that the composition of the cultivation medium exerts a significant influence both on mycelial growth and on the production of lasiodiplodan. Another behavior observed is a reduction of 9.4% of the lasiodiplodan content at 96 h, compared to that at 72 h of cultivation. This suggests the production of enzymes such as (1→6)-β-D-glucanase by the fungus under conditions of low substrate availability such as during the late stationary phase of growth, which would promote the hydrolysis of lasiodiplodan β-glucan to serve as an energy source, as previously described by Cunha et al., (2012) and Acosta et al., (2020) for *L.theobromae* MMPI. A similar trend was observed with *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 that produces the β-(1→3)(1→6)-mixed linked D-glucan (botryosphaeran), which is consumed as an energy source during substrate (glucose) starvation as occurs in the late stationary growth phase (Giese et al., 2011).

The proximal composition, amino acid and lipid profiles of the mycelial biomass produced in the culture medium based on enzymatic hydrolyzed of Brewers yeast supplemented with sucrose are described in Table 5. The mycelial biomass proved to be rich in protein (30.54 g 100 g⁻¹), which presented all the essential amino acids, with higher concentrations of leucine (69 mg g⁻¹), lysine (62.2 mg g⁻¹), valine (44.2 mg g⁻¹) and threonine (43.2 mg g⁻¹). The presence of high contents of branched-chain amino acids, such as leucine, isoleucine (35 mg g⁻¹), and valine is highlighted, which make up almost a third of the total proteins needed for muscle synthesis (Neinast et al., 2019). The total content of essential amino acids corresponded to 40.41% of the total amino acids present in the mycelial biomass. Similar values (46.59%) were reported by Angelova et al. (2022) in mycelial biomass of *Trametes versicolor* NBIMCC 8939 obtained in submerged cultivation in a medium based on glucose, yeast extract,

peptone, malt extract, and mineral salts. Regarding non-essential amino acids, high concentrations were found for aspartic acid (85.8 mg g⁻¹) and glutamic acid (103.5 mg g⁻¹).

By contrast, the mycelial biomass of *L. theobromae* MMPI did not prove to be rich in lipids, presenting a total lipid content of 4.63 g 100 g⁻¹. Unsaturated fatty acids accounted for 49.6% of the total fat content, with emphasis on polyunsaturated linoleic fatty acid (*omega*-6: 1.18 g 100 g⁻¹) and monounsaturated oleic acid (*omega*-9: 0.96 g 100 g⁻¹). Fatty acids from the *omega*-3 family was also detected (α -linolenic acid: 30 mg 100 g⁻¹). Linoleic fatty acid has also been reported as the predominant mycelial fatty acid in strains of *Pleurotus abalonus*, *P. calyptratus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* and *P. sapidus* (Dimou et al., 2002).

The mycelial biomass showed a content of 7.42 g 100 g⁻¹ of dietary fiber. The dietary fiber in fungal mycelium arises mainly from the presence of glucans and chitin, which are the two main cell wall components classified as dietary fiber (Rousta et al., 2022). Appreciable mineral content was found in the fungal mycelium (1.26 g 100 g⁻¹), and is possibly due to the high mineral content present in the spent Brewers yeast used to obtain the enzymatic lyzate, which was used in the preparation of the fermentation nutrient medium. The fermentation medium was also supplemented with dibasic potassium phosphate (2 g L⁻¹) and magnesium sulfate (2 g L⁻¹), which possibly were absorbed by the mycelium. Likewise, mycelial biomass proved to be a rich source of energy (380.38 kcal 100 g⁻¹) due to its high protein and total carbohydrate content.

Table 4.

Proximal composition, profile of amino acids and lipids from cell biomass of *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

Proximal composition*			
Moisture (% at 105 °C)	9.42 ± 0.11	Total Carbohydrates	54.17 ± 1.09
Crude Protein	30.53 ± 1.82	Dietary fiber	7.42
Total fat	4.62 ± 0.76	Mineral residue (ash)	1.26 ± 0.59
Calorific value	380.38 kcal 100 g ⁻¹		
Essential Amino Acids **		Non-essential amino acids **	
		FAO/WHO***	
Phenylalanine	1.7	-	Aspartic acid 85.8
Histidine	20.0	15	Glutamic acid 103.5
Isoleucine	35.0	30	Alanine 67.1
Leucine	69.0	59	Arginine 67.8
Lysine	62.2	45	Cystine 7.5
Methionine	13.4	-	Glycine 48.5
Threonine	43.2	23	Proline 38.6
Tryptophan	12.1	6	Serine 44.2
Valine	44.2	39	Tyrosine 27.8
Sulfur-containing Amino Acids**		Aromatic Amino Acids**	
			FAO/WHO***
Methionine + Cystine	20.9	22	Phenylalanine+ Tyrosine 61.5 38
Monounsaturated fatty acids (MUFA)#			
Palmitoleic Acid (C16:1n7)	0.09	Oleic Acid (C18:1n9c)	0.96
Elaidic Acid (C18:1n9t)	0.01		
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)#			
Linoleic Acid LA (C18:2n6c)	1.18	α-Linolenic Acid LNA (C18:3n3)	0.03
Saturated fatty acids (SFA)#			
Myristic Acid (C14:0)	0.05	Arachidic Acid (C20:0)	0.04
Palmitic Acid (C16:0)	1.22	Behenic Acid (C22:0)	0.04
Margaric Acid (C17:0)	0.01	Tricosanoic Acid (C23:0)	0.01
Stearic Acid (C18:0)	0.86	Lignoceric Acid (C24:0)	0.10
Total lipids*			
Fat Monounsaturated	1.07	Fats Unsaturated	2.29
Fat Polyunsaturated	1.22	Fats Saturated	2.33

*g 100 g⁻¹; ** mg g⁻¹ protein; ***daily recommendation for adults (>18 years) in milligrams per grams of protein according to FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / WHO: World Health Organization. (FAO, 2013). #g 100 g⁻¹. &Recommended Daily Value, according to Instrução Normativa (IN) 75 of October 8, 2020 of Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020).

3.4. FT-IR spectroscopy and X-Ray diffractometry (DRX)

Typical absorption bands of polysaccharides (Fig. 5) were observed in the region between 400 cm^{-1} and 4000 cm^{-1} with characteristic signs of lasiodiplodan from *L. theobromae* MMPI cultivated on medium formulated with cell lysate and medium based on sucrose (control sample). Bands of strong intensity in the regions of 3303 cm^{-1} (Fig. 5A) and 3291 cm^{-1} (Fig. 5B) are assigned to the stretching vibration of the hydroxyl group; a group characteristic of carbohydrates and present in the lasiodiplodan macromolecule (Acosta et al., 2020; da Silva Fonseca et al., 2020).

The absorption bands at 2926 cm^{-1} and 2880 cm^{-1} are attributable to symmetric and asymmetric stretching of the methylene group (C-H), respectively (Acosta et al., 2020; Hou et al., 2015). The band at 1634 cm^{-1} is attributed to stretching of the C=O bond (Cornet et al., 2018). The signal at 1634 cm^{-1} may also be associated with the OH deformation band of water adsorbed on the polysaccharide (Gangoiti et al., 2017). Bands in the region of $1500 - 1200\text{ cm}^{-1}$ consist of a combination of CH₂ deformations and C-O-H bending vibrations (He et al., 2022).

The high intensity band at 1029 cm^{-1} corresponds to the C-O stretching vibration (Queiroz et al., 2014), and the bands at 884 cm^{-1} (Fig. 5A) and 887 cm^{-1} (Fig. 5B) are attributable to the glycosidic bond, possibly with a β configuration (C-1-H(β)) (Calegari et al., 2019; Muhidinov et al., 2020). The bands at 622 cm^{-1} and 564 cm^{-1} are related to the carbohydrate skeletal vibrations, and information of polysaccharide structure given in this region is limited and rarely discussed (Hong et al., 2021).

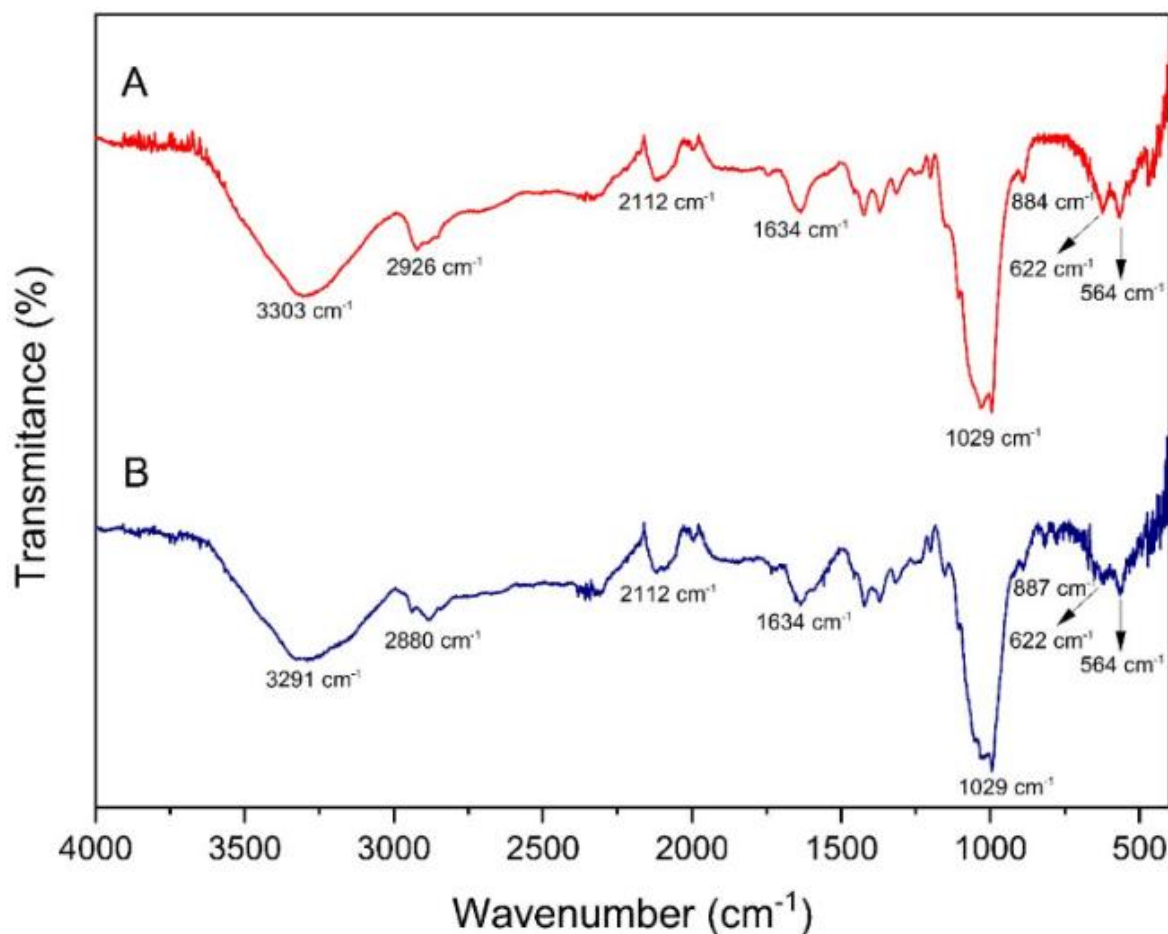


Fig. 5.

FT-IR spectra of lasiodiplodan produced on nutrient medium containing Vogel minimum salts medium with sucrose as the carbon source (A). Lasiodiplodan produced on medium based on cell lysate and sucrose as the substrate (B).

Fig. 6 shows the diffractogram profiles of lasiodiplodan samples produced on VMSM with sucrose as carbon source (Fig. 6A), and medium based on cell lysate and sucrose (Fig. 6B). The lasiodiplodan samples showed XRD patterns typical of high molecular weight carbohydrate polymeric molecules that do not have a conventional crystalline structure, which is verified by broad peaks. The XRD pattern of β -glucan produced in a medium based on cell lysate shows a broad diffraction peak between 14.5° (2θ) and 30° (2θ), similar to that observed by Zhao et al., (2022) in Qingke β -glucan samples. Interestingly, the lasiodiplodan sample produced in the VMSM medium showed two other peaks between 29° (2θ) and 34.5° (2θ) and between 43° (2θ) and 45° (2θ). Such peaks could be associated with minerals in the sample since VMSM is a medium rich

in calcium, phosphorus, magnesium, potassium, and sodium, which could interact with the hydroxyls of the polymeric structure of the macromolecule.

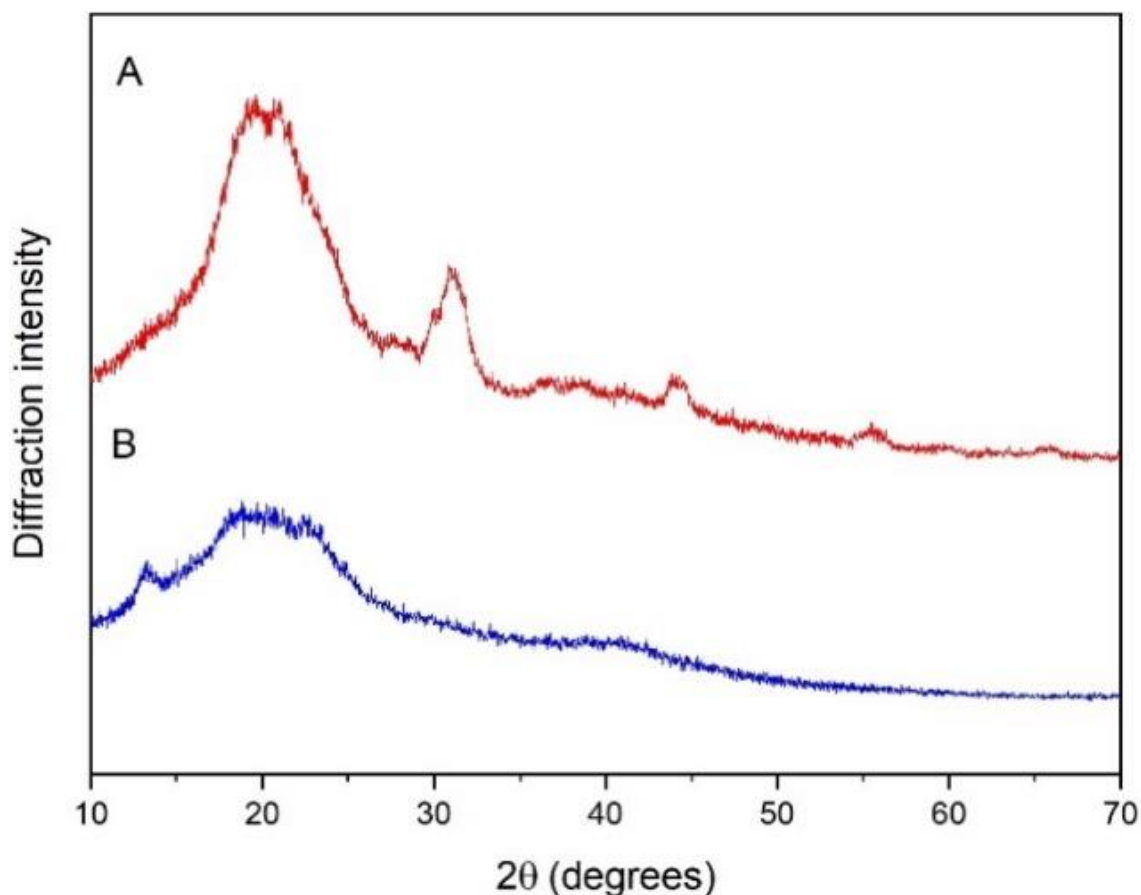


Fig. 6.

X-ray diffractogram of lasiodiplodan produced on Vogel minimal salts medium with sucrose as the carbon source (A). Lasiodiplodan produced in medium based on cell lyzate and sucrose as the substrate (B).

4. CONCLUSION

Spent Brewers yeast has nutritional quality as a substrate for cultivating the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI and producing lasiodiplodan. *L. theobromae* MMPI was demonstrated to be effective in the co-production of lasiodiplodan ((1→6)-β-D-glucan)) and single-cell protein in submerged fermentation using spent Brewers yeast cell lyzate-based culture medium. Enzymatic hydrolysis of the yeast biomass promoted greater cell rupture. The mycelial biomass presented high concentrations of leucine,

lysine, valine, and threonine. The potential for the co-production of mycelial biomass and β -glucan by *L. theobromae*, as a proposal for an integrative biorefinery process to generate two bioproducts with added-value was demonstrated.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

Not applicable.

CRedit authorship contribution statement

Holdai Carlos Emerich Heringer: Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft. **Marcelo Luis Kuhn Marchiolo:** Software, Investigation. **Daiane Meneguzzi:** Methodology, Formal analysis. **Aneli M. Barbosa-Dekker:** Conceptualization, Validation. **Robert F. H. Dekker:** Data Curation, Writing - Review & Editing. **Mario Antônio Alves da Cunha:** Funding acquisition, Resources, Supervision Project administration, Writing - Review & Editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fundação Araucária (Convênio 282/2022 - NAPI SUDOESTE 3793-1 13539-9) and Grüntec Fertilizantes Eirele for financial support. This work was also supported by CAPES - Brazil. The authors thank the Multiuser Analysis Center of the Federal University of Technology – Paraná (Campus Pato Branco) for the analytical support provided. The authors mention and thank Brauhalle Cervejaria (Pato Branco-PR) for supplying the residual spent Brewers yeast, and Dr. Luis Norberto Flores from LNF Latino America (Brazil) for supplying the enzyme Alcalase® 2.4 LFG.

5. REFERENCES

- Abdeshahian, P., Ascencio, J.J., Philippini, R.R., Antunes, F.A.F., dos Santos, J.C., da Silva, S.S., 2020. Utilization of sugarcane straw for production of β -glucan biopolymer by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 in batch fermentation process. *Bioresour. Technol.* 314, 123716. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123716>
- Acosta, S.B.P., Marchioro, M.L.K., Santos, V.A.Q., Calegari, G.C., Lafay, C.B.B., Barbosa-Dekker, A.M., Dekker, R.F.H., da Cunha, M.A.A., 2020. Valorization of soybean molasses as fermentation substrate for the production of microbial exocellular β -Glucan. *J. Polym. Environ.* 28, 2149–2160. <https://doi.org/10.1007/S10924-020-01758-Z/METRICS>
- Angelova, G., Brazkova, M., Mihaylova, D., Slavov, A., Petkova, N., Blazheva, D., Deseva, I., Gotova, I., Dimitrov, Z., Krastanov, A., 2022. Bioactivity of biomass and crude exopolysaccharides obtained by controlled submerged cultivation of medicinal mushroom *trametes versicolor*. *J. Fungi.* 8, 738. <https://doi.org/10.3390/JOF8070738>
- Angelova, M.I., Bitbol, A.F., Seigneuret, M., Staneva, G., Kodama, A., Sakuma, Y., Kawakatsu, T., Imai, M., Puff, N., 2018. pH Sensing by lipids in membranes: The fundamentals of pH-driven migration, polarization and deformations of lipid bilayer assemblies. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1860, 2042–2063. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2018.02.026>
- ANVISA, 2020. Instrução normativa - IN N° 75, de 8 de outubro de 2020. Brazil. URL http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN+75_2020_.pdf/7d74fe2d-e187-4136-9fa2-36a8dcfc0f8f (Accessed 01 December 2022).
- AOAC, 2016. Official methods of analysis of AOAC international, 20th ed. Rockville, USA.
- Bertolo, A.P., Biz, A.P., Kempka, A.P., Rigo, E., Cavalheiro, D., 2019. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): Evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. *J. Food Sci. Technol.* 56, 3697–3706. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3>
- Calegari, G.C., Santos, V.A.Q., Barbosa-Dekker, A.M., Busso, C., Dekker, R.F.H., da Cunha, M.A.A., 2019. Sulfonated (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan (*Lasiodiplodan*): Preparation, characterization and bioactive properties. *Food Technol. Biotechnol.* 57, 490–502. <https://doi.org/10.17113/FTB.57.04.19.6264>

- Cornet, I., Wittner, N., Tofani, G., Tavernier, S., 2018. FTIR as an easy and fast analytical approach to follow up microbial growth during fungal pretreatment of poplar wood with *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Methods* 145, 82–86. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2018.01.004>
- Corradi da Silva, M. de 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., Sasaki, G.L., Carbonero, E.R., 2008. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Carbohydr. Res.* 343, 793–798. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.021>
- Cunha, M.A., 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., 2012. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1179–1188. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1112-2>
- da Silva Fonseca, M., Marchioro, M.L.K., Guimarães, D.K.S., Góes-Neto, A., Drechsler-Santos, E.R., Santos, V.A.Q., Barbosa-Dekker, A.M., Dekker, R.F.H., Cunha, M.A.A., 2020. *Neodeightonia phoenicum* CMIB-151: Isolation, molecular identification, and production and characterization of an exopolysaccharide. *J. Polym. Environ.* 28, 1954–1966. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01744-5>
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M., Aggelis, G., 2002. Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol. Res.* 106, 925–929. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006184>
- FACT.MR, 2021. Supply shortages of polysaccharides and oligosaccharides anticipated as the world battles Covid-19. URL <https://www.factmr.com/report/427/polysaccharides-oligosaccharides-market> (Accessed 01 January 2022).
- FAO/WHO-World Health Organization. 2013. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. FAO-Food and Nutrition Paper. (Centre for Genomic Pathogen Surveillance).
- Gangoiti, M. V., Puertas, A.I., Hamet, M.F., Peruzzo, P.J., Llamas, M.G., Medrano, M., Prieto, A., Dueñas, M.T., Abraham, A.G., 2017. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydr. Polym.*

- 170, 52–59. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.04.053>
- Giese, E.C., Dekker, R.F.H., Scarminio, I.S., Barbosa, A.M., da Silva, R., 2011. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. *Biochem. Eng. J.* 53, 239–243. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2010.10.013>
- He, Z., Liu, Y., Kim, H.J., Tewolde, H., Zhang, H., 2022. Fourier transform infrared spectral features of plant biomass components during cotton organ development and their biological implications. *J. Cott. Res.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S42397-022-00117-8/TABLES/5>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A.M., Fenelon, M., Tiwari, B., 2017. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods (Basel, Switzerland)* 6, 1–21. <https://doi.org/10.3390/FOODS6070053>
- Hong, T., Yin, J.Y., Nie, S.P., Xie, M.Y., 2021. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chem. X* 12, 100168. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2021.100168>
- Hou, Y., Ding, X., Hou, W., 2015. Composition and antioxidant activity of water-soluble oligosaccharides from *Hericium erinaceus*. *Mol. Med. Rep.* 11, 3794–3799. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.3121/HTML>
- Islam, M.S., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P.R., 2017. A Review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines* 2017, Vol. 8, Page 83 8, 83. <https://doi.org/10.3390/MI8030083>
- Jacob, F.F., Hutzler, M., Methner, F.J., 2019. Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. *Eur. Food Res. Technol.* 245, 95–109. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3143-z>
- Keller, P., Noor, E., Meyer, F., Reiter, M.A., Anastassov, S., Kiefer, P., Vorholt, J.A., 2020. Methanol-dependent *Escherichia coli* strains with a complete ribulose monophosphate cycle. *Nat. Commun.* 11, 5403. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19235-5>
- Kerby, C., Vriesekoop, F., 2017. An overview of the utilisation of brewery by-products as generated by british craft breweries. *Beverages* 2017, Vol. 3, Page 24 3, 24. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES3020024>
- Lasta, E.L., da Silva Pereira Ronning, E., Dekker, R.F.H., da Cunha, M.A.A., 2021.

- Encapsulation and dispersion of *Lactobacillus acidophilus* in a chocolate coating as a strategy for maintaining cell viability in cereal bars. *Sci. Reports* 2021 11 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00077-0>
- 360 Market Updates, 2023. Single Cell Protein Products Market Research Size 2023-2029. URL <https://www.marketwatch.com/press-release/single-cell-protein-products-market-research-size-2023-2029-2023-05-28nt> (Accessed 05 August 2023).
- Muhidinov, Z.K., Bobokalonov, J.T., Ismoilov, I.B., Strahan, G.D., Chau, H.K., Hotchkiss, A.T., Liu, L.S., 2020. Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan. *Food Hydrocoll.* 105, 105768. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.105768>
- Natani Lupatini, K., Cristina Zenatti, D., Damasceno Gomes, S., Dal, S., Lucas, M., Guedes Batista Torres, D., Gabriela dos Santos, K., Monique Tietz, C., 2013. Proteína microbiana em biomassa residual de reatores anaeróbios para produção de hidrogênio a partir de resíduo líquido de fecularia. *Rev. Bras. Energ. Renov.* 3, 52–63.
- Neinast, M., Murashige, D., Arany, Z., 2019. Branched chain amino acids. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 139–164. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-020518-114455>
- Oliveira, K.S.M., Di Bastiani, M., Cordeiro, L.M.C., Costa, M.F., Toledo, K.A., Iacomini, M., Babosa, A.M., Dekker, R.F.H., Nascimento, V.M.G., 2015. (1→6)- and (1→3)(1→6)-β-glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. *Carbohydr. Polym.* 133, 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.060>
- Queiroz, M.F., Melo, K.R.T., Sabry, D.A., Sasaki, G.L., Rocha, H.A.O., 2014. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Mar. Drugs.* 13, 141-158. <https://doi.org/10.3390/MD13010141>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., Polak-Berecka, M., 2020. Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ* 8, e9427. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.9427>
- Rousta, N., Larsson, K., Fristedt, R., Undeland, I., Agnihotri, S., Taherzadeh, M.J., 2022. Production of fungal biomass from oat flour for the use as a nutritious food source. *NFS J.* 29, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.NFS.2022.09.001>
- Steluti, R.M., Giese, E.C., Piggato, M.M., Sumiya, A.F.G., Covizzi, L.G., Job, A.E., Cardoso, M.S., Corradi Da Silva, M.D.L., Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., 2004.

- Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *J. Basic Microbiol.* 44, 480–486. <https://doi.org/10.1002/JOBM.200410415>
- Takaloo, Z., Nikkhah, M., Nemati, R., Jalilian, N., Sajedi, R.H., 2020. Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A comparative study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 68. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02840-3>
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., Wang, T., 2023. Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 151–166. <https://doi.org/10.4014/JMB.2207.07057>
- Tian, Y., Li, Jianzheng, Meng, J., Li, Jiuling, 2023. High-yield production of single-cell protein from starch processing wastewater using co-cultivation of yeasts. *Bioresour. Technol.* 370, 128527. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128527>
- Vasconcelos, A.F.D., Monteiro, N.K., Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., Carbonero, E.R., Silveira, J.L.M., Sasaki, G.L., da Silva, R., de Lourdes Corradi da Silva, M., 2008. 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. *Carbohydr. Res.* 343, 2481–2485. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.06.013>
- Vogel, V., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microb Genet Bull* 13, 42–43.
- Wan, M., Wang, M., Zhao, Y., Deng, H., Tan, C., Lin, S., Kong, Y., Tong, Y., Meng, X., 2021. Extraction of mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its chemical composition and molecular structure. *Int. J. Biol. Macromol.* 193, 2252–2259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.057>
- Zainuddin, M.F., Fai, C.K., Ariff, A.B., Rios-Solis, L., Halim, M., 2021. Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts. *Microorg.* 2021, 9, 251. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020251>
- Zarei, O., Dastmalchi, S., Hamzeh-Mivehroud, M., 2016. a simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media. *Iran. J. Pharm. Res.* 15, 907–913.

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316271/pdf/ijpr-15-907.pdf>].

Zhang, B., Ren, D., Liu, Q., Liu, X., Bao, J., 2023. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. *Bioresour. Technol.* 384, 129345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129345>

Zhao, L., Lin, S., Lin, J., Wu, J., Chen, H., 2022. Effect of acid hydrolysis on the structural and antioxidant characteristics of β -glucan extracted from Qingke (Tibetan hulless barley). *Front. Nutr.* 9, 1052901. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1052901/BIBTEX>.

6 CONCLUSÃO

A biomassa residual de levedura cervejeira possui qualidade nutricional e potencial como substrato para cultivo do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI e produção de lasiodiplodana. A biomassa da levedura residual exibiu altos teores de proteína bruta, nitrogênio, carbono orgânicos e minerais. *L. theobromae* MMPI demonstrou ser eficaz na coprodução de lasiodiplodan ((1→6)-β-D-glucano) e *single-cell protein* (biomassa celular) em fermentação submersa usando meio de cultura à base de lisado celular de levedura residual de cervejaria. A hidrólise enzimática dessa biomassa industrial com Alcalase® 2.4 LFG promoveu maior ruptura celular e maior liberação de componentes solúveis intracelulares, além de produzir um extrato com maior teor de proteínas solúveis. Por outro lado, o tratamento térmico foi a condição de lise celular menos eficaz para a ruptura celular. A suplementação de sacarose no meio de crescimento fúngico à base de lisado celular contribuiu para maior crescimento micelial, mas não contribuiu para maior conversão do substrato assimilado em lasiodiplodana. Este fenômeno sugere que não há correção imediata entre o crescimento micelial e a conversão do substrato em lasiodiplodana no meio de cultura estudado. A suplementação mineral do meio promoveu aumento da produção de lasiodiplodana, sem a necessidade de utilização de altas concentrações de sais (0,5 g L⁻¹: MgSO₄.7H₂O e K₂HPO₄). A utilização de 60 g L⁻¹ de sacarose associada a 7 g L⁻¹ de proteínas totais (lisado celular) e 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 0,5 g L⁻¹ de sais de K₂HPO₄ foi considerada a melhor condição nutricional para o cultivo de *L. theobromae* MMPI. Nessa condição, obteve-se biomassa micelial rica em proteínas (30,54 g 100 g⁻¹) e contendo todos os aminoácidos essenciais. A biomassa micelial apresentou altas concentrações de leucina (69 mg g⁻¹), lisina (62,2 mg g⁻¹), valina (44,2 mg g⁻¹) e treonina (43,2 mg g⁻¹). Também foi observado alto teor do aminoácido de cadeia ramificada isoleucina (35 mg g⁻¹). As condições de cultivo permitiram a obtenção de biomassa micelial com baixo teor de gordura (4,63 g 100 g⁻¹). Os ácidos graxos insaturados representaram 49,6% do teor de gordura total, com destaque para o ácido linoleico poliinsaturado (*ômega* 6: 1,18 g 100 g⁻¹) e ácido oleico monoinsaturado (*ômega* 9: 0,96 g 100 g⁻¹). A biomassa micelial produzida apresenta potencial nutritivo, principalmente em relação ao seu perfil de aminoácidos, podendo ser estudada como opção de ingrediente em produtos alimentícios ou rações animais. Esta pesquisa demonstrou o potencial de coprodução de biomassa micelial e fúngica

β -glucana (lasiodiplodana) por *L. theobromae* MMPI, como uma proposta de processo de biorrefinamento integrado para gerar dois bioprodutos com valor agregado

REFERÊNCIAS

AKRAMIENE, D. et al. *Effects of beta-glucans on the immune system*. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.

ALVES, E. M.; DE SOUZA, J. F.; DE OLIVA NETO, P. *Advances in yeast autolysis technology - A faster and safer new bioprocess*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 2021.

BERLOWSKA, J. et al. *Utilization of post-fermentation yeasts for yeast extract production by autolysis: the effect of yeast strain and saponin from *Quillaja saponaria**. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 3, p. 396–401, jul. 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Mercado cervejeiro cresce no Brasil e aumenta interesse pela produção nacional de lúpulo e cevada — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/08/mercado-cervejeiro-cresce-no-brasil-e-aumenta-interesse-pela-producao-nacional-de-lupulo-e-cevada>>. Acesso em: 27 mar. 2022.

BURD, N. A. et al. *Dietary protein quantity, quality, and exercise are key to healthy living: a muscle-centric perspective across the lifespan*. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, 6 jun. 2019.

CALEGARI, G. C. et al. *Sulfonated (1→6)-β-D-Glucan (lasiodiplodan)*. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 490–502, 2019.

CARBONERO, E. R. et al. *Unusual partially 3-O-methylated α-galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus**. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 252–257, jan. 2008.

CERVBRASIL. Mercado Cervejeiro. 2021.

CONWAY, J. **Beer production worldwide from 1998 to 2020**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

CORRADI DA SILVA, M. DE L. et al. *Structural characterization of the cell wall d-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05*. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 793–798, mar. 2008.

CRISTINA BUENO, Y. **Biomassa do fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*: Composição química e utilização como nutriente para bioprocesso**. Rio Claro: [s.n.].

CUNHA, M. A. et al. *Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β- D: -glucan from Lasiodiplodia theobromae MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 1 ago. 2012.

DE LIMA, C. P. et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius Allelopathic effects and toxicity against *Artemia salina* Leach of extracts of the fruit of *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botânica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 331–336, 1 jun. 2011.

DERONCELÉ THOMAS, V. M. et al. *Uses of an exopolysaccharide-protein complex obtained from a bacterium*. 22 mar. 2018.

DONOT, F. et al. *Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, jan. 2012.

EL-NEWARY, S. A. et al. *Production, characterization and biological activities of acidic exopolysaccharide from marine Bacillus amyloliquefaciens 3MS 2017*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 7, p. 652–662, jul. 2017.

FACT.MR. **Supply Shortages of Polysaccharides and Oligosaccharides Anticipated as the World Battles Covid-19**. Disponível em: <<https://www.factmr.com/report/427/polysaccharides-oligosaccharides-market>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

FEREGUETI COSTA, L. **Leveduras na nutrição animal**. [s.l: s.n.].

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. *Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77–84, fev. 2010.

FERREIRA, R. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FILHO, A. B. M. ;; VASCONCELOS, M. A. S. **Produção Alimentícia**. [s.l: s.n.].

FONSECA, M. D. S. Obtenção e caracterização de um exopolissacarídeo produzido por *neodeightonia phoenicum*. 29 ago. 2019.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. *Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production*. **Bioresource technology**, v. 245, n. Pt B, p. 1674–1683, 1 dez. 2017.

GONZÁLEZ, A. M. et al. *Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 59–61, 2007.

GUO, M. Q. et al. *Polysaccharides: Structure and Solubility*. **Solubility of Polysaccharides**, 29 nov. 2017.

HAMMAD, S. A. R.; ALI, O. A. M. *Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 133–145, 1 jun. 2014.

HENCHION, M. et al. *Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium*. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 7, p. 1–21, 1 jul. 2017.

HUIGE, N. J. *Brewery By-Products and Effluents*. **Handbook of Brewing**, p. 670–729, 22 fev. 2006.

IKEWAKI, N. et al. *β -glucans: wide-spectrum immune-balancing food-supplement-based enteric (β -WIFE) vaccine adjuvant approach to COVID-19*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 8, p. 2808, 2021.

JACOB, F. F.; HUTZLER, M.; METHNER, F.-J. *Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content*. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 1, p. 95–109, 23 jan. 2019.

KAGIMURA, F. Y. et al. *Biological activities of derivatized d-glucans: A review*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, jan. 2015a.

KAGIMURA, F. Y. et al. *Carboxymethylation of (1 \rightarrow 6)- β -glucan (Iasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation*. **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 390–399, 20 ago. 2015b.

KELLER, P. et al. *Methanol-dependent Escherichia coli strains with a complete ribulose monophosphate cycle*. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5403, 26 dez. 2020.

KERBY, C.; VRIESEKOOOP, F. *An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries*. **Beverages 2017, Vol. 3, Page 24**, v. 3, n. 2, p. 24, 12 jun. 2017.

LATIMER, G. W.; HORWITZ, W. **Official Methods os Analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg, MD USA: [s.n.].

LATIMER, G. W. JR. **Official Methods os Analysis of AOAC International**. 20. ed. Rockville, USA: [s.n.]. v. 1

LESAGE, G.; BUSSEY, H. *Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 70, n. 2, p. 317–343, jun. 2006.

LIMA, N. F. C. Glucanas produzidas por microrganismo: potencial prebiótico. 6 maio 2019.

LIU, D. et al. *Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 181–192, ago. 2016.

LIU, J. et al. *Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1113–1124, 10 fev. 2017.

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

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. *Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic Fusarium solani SD5*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 627–634, set. 2013.

MALFATTI, C. R. M. et al. *Intracerebroventricular administration of the (1→6)- β -D-glucan (IASIDIPODAN) in male rats prevents d-penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex*. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1289–1294, 2017.

MARKET REPORTS WORLD. **Single Cell Protein Products Market Size 2022 Global Comprehensive Research Study, Trends, Share, Development Status, Opportunities, Future Plans, Competitive Landscape and Growth by Forecast 2027**. Disponível em: <<https://www.marketwatch.com/press-release/single-cell-protein-products-market-size-2022-global-comprehensive-research-study-trendsshare-development-status-opportunities-future-plans-competitive-landscape-and-growth-by-forecast-2027-2022-03-17>>. Acesso em: 1 maio. 2022.

MARSON, G. V. et al. *Maillard conjugates from spent brewer's yeast by-product as an innovative encapsulating material*. **Food Research International**, v. 136, p. 109365, out. 2020.

MATHIAS, T. R. DOS S. et al. *Brewery Waste Reuse for Protease Production by Lactic Acid Fermentation*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 218, 1 abr. 2017.

MEKONNEN, M. M.; HOEKSTRA, A. Y. *Water footprint benchmarks for crop production: A first global assessment*. **Ecological Indicators**, v. 46, p. 214–223, 1 nov. 2014.

MELLO, M. B. et al. *Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays*. **Toxicology**, v. 376, p. 66–74, 1 fev. 2017.

MITSUHASHI, S. *Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 38–44, abr. 2014.

NATANI LUPATINI, K. et al. Proteína microbiana em biomassa residual de reatores anaeróbios para produção de hidrogênio a partir de resíduo líquido de fecularia. **Revista brasileira de energia renováveis**, v. 3, p. 52–63, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.

NISSOLA, C. **Hidrogel contendo (1-6)-B-D-glucana (lasiodiplodana): desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante**. [s.l: s.n.].

NOSS, I. et al. *Comparison of the potency of a variety of β -glucans to induce cytokine production in human whole blood*. **Innate immunity**, v. 19, n. 1, p. 10–19, fev. 2013.

OLAJIRE, A. A. *The brewing industry and environmental challenges*. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, p. 102817, maio 2020.

OLIVEIRA, A. M.; NETO, P. **Otimização da autólise de *Saccharomyces cerevisiae* de cervejaria e extração de RNA**. [s.l: s.n.].

OORLANDELLI, R. C.; et al. **US20170224602 Cosmetic composition containing halomonas ferment extract, and use thereof**. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US202131895&docAn=15521774>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ORLANDELLI, R. C. et al. *Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: Preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture of *Diaporthe* sp. JF766998 under different cultivation time*. **Biochimie Open**, v. 2, p. 33–40, 1 jun. 2016.

OSEMWEIGIE, O. O. et al. *Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa*. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04205, 1 jun. 2020.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais**. Macéio: EDUFAL, 2005.

RACHWAŁ, K. et al. *Utilization of brewery wastes in food industry*. **PeerJ**, v. 8, 14 jul. 2020.

RASANE, P. et al. *Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 662–675, 25 fev. 2015.

RE, R. et al. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

SINGH, R. P. et al. *Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis**. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1019–1026, mar. 2011.

SOKOLOWSKI, C. M. et al. *The relationship between animal and plant protein intake and overall diet quality in young adults*. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 8, p. 2609–2616, ago. 2020.

SOUZA, T. et al. *Padronização da produção de biocurativos Dérmico-Epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana / Standardization of the production of Dermal-Epidermal biocuratives of Chitosan, Xantan and Beta-Glucan*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5496–5506, 1 jun. 2020.

STOFFEL, F. et al. *Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 58, 1 dez. 2019.

SUMAN, G. et al. *Review Article Single Cell Protein Production: A Review*. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 9, p. 251–262, 2015.

TABUCHI, S. C. T. et al. *Kinetic Study of Lasiodiplodan Production by *Lasiodiplodia theobromae* MMPI in a Low-Shear Aerated and Agitated Bioreactor*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 1, p. 89–102, 18 jan. 2021.

TAKALLOO, Z. et al. *Modulation of the competition between renaturation and aggregation of lysozyme by additive mixtures*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.1864, 29 dez. 2019.

TAKALLOO, Z. et al. *Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 68, 24 maio 2020.

TEIXEIRA, P. et al. **Manual de métodos de análise de solo**. 3^o ed. Brasília: [s.n.].

THEIS, T. V. et al. *Fungal Exocellular (1-6)- β -d-glucan: Carboxymethylation, Characterization, and Antioxidant Activity*. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, 1 maio 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. [s.l.] Grupo A, 2017.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. *The determination of amino-acids with ninhydrin*. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209–214, 1 jan. 1955.

ZAREI, O.; DASTMALCHI, S.; HAMZEH-MIVEHROUD, M. *A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media*. **Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 907–913, 2016.