

VII *Workshop* de Ciência, Tecnologia e Inovação 19 e 20 de setembro de 2023 Francisco Beltrão



AVALIAÇÃO DA BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDOS PELO FUNGO Lasiodiplodia theobromae MMPI

Marcelo Luis Kuhn MARCHIORO¹, Mário Antônio Alves da CUNHA¹.

¹Departamento Acadêmico de Química Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Pato Branco Pato Branco – Paraná - Brasil

E-mails: <u>marchioro82@gmail.com</u>, mcunha@utfpr.edu.br.

Resumo: O crescimento da população mundial tem aumentado a demanda por fontes alimentares alternativas. Neste sentido, as single-cell proteins (SCP), proteínas produzidas a partir de algas, fungos e bactérias vêm ganhando destaque nos últimos anos. No presente estudo, o fungo ascomiceto Lasiodiplodia theobromae MMPI foi produzido em cultivo submerso usando meio sintético (sacarose) e meio a base de melaço de soja. A biomassa e o exopolissacarídeo (lasiodiplodana) obtidos foram caracterizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TG), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difratometria de raio-x (DRX). As micrografias indicaram que a composição do meio tem influência na morfologia tanto das amostras de biomassa quanto nas de lasiodiplodana. A análise termogravimétrica demonstrou que as amostras possuem elevada estabilidade térmica, e que a lasiodiplodana tem natureza essencialmente amorfa. Através das técnicas utilizadas foi possível caracterizar as amostras de biomassa e lasiodiplodana.

Palavras-chave: Micoproteína; Subproduto agroindustrial; Bioprospecção; Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial, a busca por fontes alternativas de alimentos vem aumentando exponencialmente. Alimentos ricos em proteínas produzidos a partir de algas, fungos (fungos filamentosos e leveduras) e bactérias, vem atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores como uma alternativa a carne vermelha (SAR *et al.*, 2022).

O termo proteínas de célula única (*single-cell proteins*), tem sido usado para designar alimentos de origem microbiana, que visam substituir alimentos de origem animal e vegetal ricos em proteínas.

Neste contexto, o presente trabalho buscou caracterizar através de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infra vermelho com transformada de Fourier, difratometria de raio-x e análise termogravimétrica a biomassa e o exopolissacarídeo (lasiodiplodana) do fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI,







produzidos por cultivo submerso utilizando meio a base de sacarose (MSAC) e meio a base de melaço de soja (MMS).

FUNDEMENTAÇÃO TEÓRICA

Embora microrganismos sejam utilizados há séculos pelo homem na produção de alimentos e rações para animais, a tecnologia e a produção em larga escala de proteínas microbianas (single-cell proteins, SCP) como alimento foi desenvolvida nos últimos 100 anos, particularmente após a primeira guerra mundial. Considerando a grande variedade de microrganismos existentes, estudos visando a condição ideal para a produção de proteína microbiana têm sido conduzidos (REIHANI; KHOSRAVI-DARANI, 2019).

As micoproteínas (proteínas de origem fúngica) podem ser utilizadas como substitutas parciais ou até mesmo totais de alimentos proteicos de origem animal, como as carnes. São fontes saudáveis de aminoácidos essenciais, vitaminas, carboidratos e carotenos. Outro aspecto de grande relevância é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo em sua produção, aliado a questões ambientais e possibilidade de produção controlada independente de clima e sazonalidade (HASHEMPOUR-BALTORK *et al.*, 2020).

Estudos reportados na literatura científica mostram a produção de biomassa proteica (SCP) a partir de fungos filamentosos, empregando tanto processos de fermentação submersa, como fermentação semissólida e cultivo em superfície. Desses sistemas de fermentação, o sistema submerso pode levar a maiores rendimentos (HASHEMPOUR-BALTORK *et al.*, 2020; SUMAN *et al.*, 2015).

Um material oriundo do processamento agroindustrial que tem sido recentemente estudado como matéria-prima para a obtenção de produtos biotecnológicos é o melaço de soja. Esta biomassa é um coproduto gerado da produção de concentrado proteico de soja, mais especificamente na etapa de lavagem do farelo desengordurado com solução hidroalcoólica (etanol 60% v/v). O melaço de soja é rico em carboidratos, encerrando em sua composição, sacarose ($\approx 28,4\%$), estaquiose ($\approx 18,6\%$), rafinose ($\approx 9,68$), e menores proporções de glicose, galactose e frutose (CALDEIRÃO *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2008). Além da alta concentração de açúcares, o melaço de soja contém nitrogênio orgânico





VII *Workshop* de Ciência, Tecnologia e Inovação 19 e 20 de setembro de 2023 Francisco Beltrão



e outros macros e micronutrientes, o que favorece sua utilização como substrato para o crescimento microbiano e síntese de produtos biológicos (CHENG *et al.*, 2017).

METODOLOGIA

O fungo *L. theobromae* MMPI foi cultivado em cultivo submerso seguindo metodologia descrita por Acosta *et al.*, (2020). Melaço de soja (MMS) e sacarose (MSAC) foram utilizados como fonte de carbono e extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio. As biomassas celulares geradas nos cultivos foram separadas do caldo fermentado, lavadas e liofilizadas para posteriores análises. Lasiodiplodana foi recuperada do caldo por precipitação com etanol, dialisada e então liofilizada (Acosta *et al.*, 2020).

Microscopia eletrônica de varredura: Micrografias com amplitudes de 200x, 600x e 1000x foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura de bancada modelo TM3000 (Hitachi, USA).

Análise termogravimétrica: O comportamento térmico das amostras obtidas nos meios a base de MMS e MSAC foi analisado em um analisador térmico SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). As condições de análise foram: faixa de temperatura de 25 a 800 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min e vazão de ar sintético de 50 mL/min.

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier: Os espectros de infravermelho (FTIR) foram obtidos em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, USA) na região de 4000-400 cm⁻¹, com 32 acumulações e resolução de 0,5 cm⁻¹, usando o método ATR.

Difratometria de Raio-X: O perfil difratométrico das amostras foi obtido em difratômetro de raio X modelo XDR-6000 (Shimadzu, USA) com fonte de radiação de lâmpada de cobre (CuK α = 1,5418 Å), corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, ângulo de varredura de 10° a 90° (2 θ), velocidade de 0,5°/min e passo de 0,02 graus.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia eletrônica de varredura: As micrografias das amostras de biomassa micelial (BIO-MMS e BIO-MSAC) e de lasiodiplodana (LAS-MMS e LAS-MSAC) obtidas a partir dos cultivos do fungo *L. theobromae* MMPI nos meios MMS e MSAC estão apresentadas na Figura 1, com ampliações de 200, 600 e 1000 vezes.







Figura 1 - Micrografias das amostras de biomassa (BIO-MMS e BIO-MSAC) e lasiodiplodana (LAS-MMS e



Fonte: Autoria própria (2023).

As micrografias BIO-MMS e BIO-MSAC (liofilizadas) mostram redes de hifas entrelaçadas as quais formam a estrutura tridimensional que constitui o micélio fúngico. As imagens de MEV sugerem que o micélio crescido no meio MMS apresenta uma rede de hifas mais contínua e emaranhada em comparação ao micélio crescido em meio MSAC. Parece haver um rompimento da estrutura fibrilar das hifas em algumas porções do micélio cultivado em meio MSAC. Outro aspecto que pode ser observado pela análise das imagens de MEV é a presença de material polimérico junto as hifas do micélio crescido em meio





VII *Workshop* de Ciência, Tecnologia e Inovação 19 e 20 de setembro de 2023 Francisco Beltrão



MSAC. Este material polimérico é atribuído a presença de lasiodiplodana a qual é produzida em grandes quantidades em meios a base de sacarose (CUNHA *et al.*, 2012).

As micrografias das amostras de lasiodiplodana produzidas nos meios contendo melaço de soja (LAS-MMS) ou sacarose (LAS-SAC) indicam que a composição do meio interfere na estrutura morfológica do biopolímero. As imagens da amostra de lasiodiplodana produzida em meio MMS mostram uma superfície irregular contendo dobras ao longo da área superficial. Outro aspecto que chama a atenção, é a presença de pontos esbranquiçados ao longo da área superficial do biopolímero obtido em meio MMS. Tais manchas esbranquiçadas podem estar associadas a possível presença de íons inorgânicos como cálcio ou magnésio junto a estrutura do polissacarídeo. Estruturas macromoleculares ricas em hidroxilas podem formar redes tridimensionais por reticulação com íons bivalentes. Neste contexto o meio MMS contém sais minerais como cálcio e magnésio oriundos do melaço de soja (RODRIGUES *et al.*, 2021). A amostra LAS-MSAC apresentou uma superfície um pouco mais irregular do que a amostra LAS-MMS, sendo verificadas áreas mais desuniformes com aspecto quebradiço.

Perfil térmico das amostras de biomassa e lasiodiplodana: Os perfis térmicos das amostras de biomassa e lasiodiplodana estão descritos na Figura 2 (curvas TGA e DTA). A biomassa celular produzida em meio MMS (Figura 2a) apresentou um primeiro estágio de perda de massa (11% de perda) entre 25 °C e 170 °C, com pico exotérmico em 50 °C (curva DTA). O segundo evento ocorreu entre 170 °C e 390 °C, com pico em 316 °C (curva DTA) e 54% de perda de massa. Posteriormente, entre 390 °C e 650 °C ocorreu dois eventos consecutivos de perda de massa (32%), com picos exotérmicos em 427 °C e 549 °C na DTA.

A biomassa micelial obtida em meio MSAC (Figura 2b) apresentou um primeiro estágio com três eventos consecutivos de perda de massa (14%) entre 25 °C e 210 °C, com pico endotérmico em 50 °C (DTA). O segundo estágio ocorreu entre 210 °C e 362 °C com perda de massa de 32%, com pico exotérmico em 314 °C (DTA). O terceiro estágio de perda de massa (42%) apresentou três eventos consecutivos entre 362 °C a 649 °C, apresentando pico exotérmico em 471 °C na DTA.







Figura 2 - Perfil térmico das biomassas miceliais (a e b) e da lasiodiplodana (c e d) produzidas em meio MMS e MSAC.



a) biomassa produzida em meio MMS; b) biomassa produzida em meio MSAC; c) lasiodiplodana produzida em meio MMS; d) lasiodiplodana produzida em meio MSAC. Fonte: Autoria própria (2023).

Lasiodiplodana produzida no meio MMS (Figura 2c) mostrou quatro estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu até 100°C com perda de massa de 8%, indicada por um pico endotérmico a 50,5°C na curva DTA. Esta perda de massa corresponde à eliminação da água de hidratação. Um segundo evento de perda de massa ocorreu entre 133°C e 377°C, resultando em uma redução de cerca de 60% na massa da amostra. Este evento é acompanhado por um pico exotérmico a 281°C (DTA), e corresponde à decomposição inicial da macromolécula. Em temperaturas mais altas, foram observados dois eventos consecutivos com perdas de massa entre 424°C e 600°C, indicados por dois picos exotérmicos em 435°C e 508°C (curvas DTA). A perda de massa com pico exotérmico a 435°C pode ser atribuída à degradação oxidativa, sendo que o último evento de perda de massa (pico exotérmico a 508°C) correspondeu à decomposição final (carbonização) da amostra.

A amostra de lasiodiplodana produzida em meio MSAC (Figura 2d) demonstrou 3 eventos de perda de massa. O primeiro indicado por um pico endotérmico em 45 °C (DTA)





que ocorreu até cerca de 120 °C, com perda de 11% de massa (eliminação de água de hidratação). Um segundo evento correspondente a decomposição inicial da molécula ocorreu entre 150 °C e 373 °C, com pico exotérmico em 332 °C. Nessa fase houve uma perda de 63% de massa. O último evento, correspondente a degradação final da molécula ocorreu de 373 °C a 510 °C, com pico exotérmico em 440 °C (DTA) e com perda de 16% de massa.

Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier: Os perfis espectroscópicos das amostras de biomassa e lasiodiplodana produzidas nos meios MSAC e MMS estão apresentadas na Figura 4. Bandas de forte intensidade são verificadas nas regiões de 3270 cm⁻¹ (Figuras 3A e 3B) e 3300 cm⁻¹ (Figuras 3C e 3D) e atribuídas ao alongamento vibracional -OH (CALEGARI *et al.*, 2017). As bandas na região de 2900 cm⁻¹ são atribuídas ao alongamento sp3 do grupo metileno, comumente presentes em polissacarídeos. O aparecimento desta banda nas biomassas pode indicar a presença de polissacarídeos aderidos ao micélio fúngico (NISSOLA *et al.*, 2021). As bandas de absorção na região de 2500 cm⁻¹ são comumente atribuídas aos dímeros de COOH ligados ao hidrogênio ((NUZZO *et al.*, 2020).



Figura 4 – perfil espectroscópico na região do infravermelho médio das amostras de da biomassa produzida em A) MSAC e B) MMS, e lasiodiplodana produzida em C) MSAC e D) MMS.

As bandas nas regiões de 2160 cm⁻¹, 2029 cm⁻¹ e 1967 cm⁻¹ podem ser associadas as ligações de dióxido de carbono (POPA; FETEA; SOCACIU, 2021). A banda em 1638 cm⁻¹ pode ser atribuída à flexão O-H. Bandas em 1398 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações de alongamento simétricas e assimétricas dos grupos CH₃ (WANG *et al.*, 2015) e em 1270 cm⁻¹







a vibração do alongamento da ligação C-O-C (TAN *et al.*, 2021). A banda em 1029 cm⁻¹ é atribuída à vibração de estiramento de C-O, que ocorre no anel piranose presente nos monômeros que compõem as glucanas. Na região de 880 cm⁻¹ aparece uma banda de baixa intensidade que pode ser atribuída a configuração β , presente na ligação glicosídica da lasiodiplodana (LUNA *et al.*, 2018).

Difratometria de Raio-X: Os perfis difratométricos das amostras obtidas nos meios MSAC e MMS estão apresentadas na Figura 4. Como pode ser observado nas Figuras 4A e 4B, as amostras de biomassa micelial demonstram um perfil essencialmente amorfo, com uma certa organização cristalina em 19° (2 θ). Perfil semelhante foi descrito por Arunprasath *et al.*, (2019) para o micélio de uma cepa do fungo *Lasiodiplodia* sp. Em contrapartida, as amostras de lasiodiplodana apresentaram diferenças em seus perfis difratométricos. A lasiodiplodana produzida em meio MSAC (Figura 4C) apresentou um único pico amplo em 20° (2 θ), indicando um material de natureza amorfa.







A lasiodiplodana produzida em meio MMS (Figura 4D), apresentou três picos com maior intensidade, em 20°, 31° e 44° a 2 θ , o que pode indicar que a amostra possui uma cristalinidade um pouco maior, mas ainda assim o material é essencialmente amorfo. Em seu trabalho, Luna *et al.*, (2018) encontrou picos em 20.9°, 23.4° e 39.4° a 2 θ , em amostra de lasiodiplodana produzida em meio sintético com glicose.







CONSIDERAÇÕES FINAIS

As micrografias de MEV demonstraram que a composição do meio de cultivo interfere na organização das hifas do micélio fúngico e na morfologia da lasiodiplodana. O análise termogravimétrica demonstrou que a biomassa e a lasiodiplodana produzidas em MSAC apresentaram maior estabilidade térmica que as produzidas em MMS.

Os espectros de infravermelho apresentaram bandas características de micélios fúngico para as biomassas miceliais e de polissacarídeos para as amostras de lasiodiplodana. A difratometria de raio-x demonstrou que as amostras possuem natureza amorfa, com pouca organização cristalina, característico desse tipo de material.

O uso de uma plataforma integrada de produção de biomassa celular e lasiodiplodana utilizando o fungo *L. theobromae* MMPI pode ser uma alternativa atrativa de biuoproecção do fungo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), a Fundação Araucária (Convênio 282/2022 - NAPI SUDOESTE 3793-1 13539-9).

REFERÊNCIAS

ACOSTA, S. B. P. *et al.* Valorization of Soybean Molasses as Fermentation Substrate for the Production of Microbial Exocellular β -Glucan. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, n. 8, p. 2149–2160, 2020.

ARUNPRASATH, T. *et al.* Biodegradation of triphenylmethane dye malachite green by a newly isolated fungus strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 17, n. December 2018, p. 672–679, 2019.

CALEGARI, G. C. *et al.* Sulfonation of $(1\rightarrow 6)$ - β -D-Glucan (Lasiodiplodan) and Its Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 5, n. 12, p. 850–863, 2017.

CHENG, C. *et al.* Polymalic acid fermentation by Aureobasidium pullulans for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 166–174, jan. 2017.

CUNHA, M. A. A. DA *et al.* Lasiodiplodan, an exocellular $(1\rightarrow 6)$ - 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, 8 ago. 2012.

HASHEMPOUR-BALTORK, F. *et al.* Mycoproteins as safe meat substitutes. *Journal of Cleaner Production*, v. 253, p. 119958, 20 abr. 2020.

NISSOLA, C. *et al.* Hydrogel containing $(1 \rightarrow 6)$ - β -D-glucan (lasiodiplodan) effectively promotes dermal wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 183, p. 316–330, 2021.

NUZZO, A. *et al.* Infrared spectra of soil organic matter under a primary vegetation sequence. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2020.

POPA, R. M.; FETEA, F.; SOCACIU, C. Atr-ftir-mir spectrometry and pattern recognition of bioactive volatiles in oily versus microencapsulated food supplements: Authenticity, quality, and stability. *Molecules*, v. 26, n. 16, 2021.

REIHANI, S. F. S.; KHOSRAVI-DARANI, K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 37, p. 34–40, 1 jan. 2019.

RODRIGUES, B. C. G. *et al.* Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, n. 4, p. 105226, 1 ago. 2021.

SAR, T. *et al.* Demo-scale production of protein-rich fungal biomass from potato protein liquor for use as innovative food and feed products. *Food Bioscience*, v. 47, n. December 2021, p. 101637, 2022.

SUMAN, G. *et al.* Single Cell Protein Production: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, n. 9, p. 251–262, 2015.

TAN, C. S. *et al.* Comparison of FTIR spectrum with chemometric and machine learning classifying analysis for differentiating guan-mutong a nephrotoxic and carcinogenic traditional chinese medicine with chuan-mutong. *Microchemical Journal*, v. 163, n. August 2020, p. 105835, 2021.

WANG, Y. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the active components in serum of rats treated with Zuogui Pill. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, v. 2, n. 4, p. 264–269, 2015.

WILLIAM N. SANCHEZ LUNA *et al.* O-Acetylated $(1\rightarrow 6)$ - β -D-Glucan (Lasiodiplodan): Chemical Derivatization, Characterization and Antioxidant Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, n. 4, p. 320–332, 8 abr. 2018.

