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

Luana Malaquias BERTOLETI[1], Marcelo Luis Kuhn MARCHIORO[1], Mário Antônio Alves da CUNHA[1].

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

E-mails: lu_bertoleti@hotmail.com, marchioro82@gmail.com, mcunha@utfpr.edu.br.

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

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

INTRODUÇÃO

Os principais produtos derivados da industrialização da soja são o óleo, proteína texturizada de soja (PTS) e o farelo de soja. No processo de extração da proteína de soja é gerado um coproduto de coloração marrom escuro denominado melaço de soja, o qual é rico

em carboidratos como glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, sendo este ainda pouco explorado como substrato para produção de produtos de elevado valor agregado. Entre os bioprodutos de elevado valor de mercado há os exopolissacarídeos (EPS), que são polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos e bactérias e excretados para o meio.

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

Dentre os microrganismos produtores de EPS tem-se o ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae MMPI*, o qual embora seja um fitopatógeno de muitas frutas tropicais, tem a capacidade de produzir uma glucana extracelular denominada lasiodiplodana. A lasiodiplodana é uma (1→6)-β-D-glucana, que apresenta algumas propriedades biológicas e tecnológicas, e sua produção a partir de subprodutos, resíduos ou coprodutos agroindustriais pode ser uma ferramenta estratégica sob o aspecto econômico.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de lasiodiplodana pelo fungo L. theobromae MMPI em fermentações submersas conduzidas em modo descontinuo e usando meio de cultivo a base de melaço de soja.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O melaço de soja é um coproduto gerado no processo de produção de concentrado proteico de soja (SIQUEIRA et al., 2008). Após a etapa de extração do óleo dos grãos previamente triturados, os flocos desengordurados (flocos brancos, também chamado de farelo de soja) são lavados com solução etanólica (70-90% v/v) para remoção de carboidratos polissacarídicos e proteínas (SARROUH et al., 2014). O material sólido lavado tem em torno de 65% (base seca) de proteínas e é chamado de concentrado proteico de soja (LONG; GIBBONS, 2013). O conteúdo de açúcar presente na soja é extraído pela solução hidroalcoólica e após a recuperação do etanol é obtido um melaço com teor de umidade de cerca de 50% (SARROUH et al., 2014).

O melaço de soja é constituído por 57,3% de carboidratos (massa seca), incluindo sacarose (28,4%), estaquiose (18,6%) e rafinose (9,68%), além de quantidades significativas de proteínas (9,44%) e lipídios (21,2%) (SIQUEIRA et al, 2008).. O melaço apresenta

composição química atrativa para uso como substrato em meios de cultivo para produção de produtos biotecnológicos de elevado valor de mercado.

Entre os produtos biotecnológicos com mercado emergente podem ser mencionadas as glucanas, as quais são empregadas como agentes texturizantes, gelificantes, emulsificantes e pré-bióticos na indústria de alimentos. Na indústria farmacêutica destaca-se por suas propriedades biológicas, como potencial anticarcinogênico, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico e atividade imunomoduladora (KAGIMURA et al., 2015). As β-glucanas são carboidratos integrantes das paredes celulares de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas, líquens e cereais como aveia e cevada ((RAHAR et al., 2011). São constituídas por estruturas altamente ordenadas compostas por cadeias constituídas por unidades de D-glucopiranose unidas por ligações glicosídicas com configuração β-anomérica (KAGIMURA et al., 2015).

METODOLOGIA

Matéria-prima, microrganismo: O melaço de soja foi cedido por uma empresa de Araguari, Minas Gerais. Para remoção de impurezas e melhor aproveitamento, o melaço de soja bruto foi submetido a um processo de clarificação (ACOSTA et al. 2020). O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) e mantido em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol, por repiques sucessivos e sob refrigeração a 5 ºC.

Preparo do inóculo e produção da lasiodiplodana: O inóculo foi preparado e padronizado conforme descrito por Kagimura et al. (2015). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL em incubadora orbital (shaker) a 28 ºC, 150 rpm por 96 horas. O meio de cultivo consistiu de melaço de soja clarificado com concentrações de açucares totais de 20 g L^{-1} e 40 g L^{-1}, e pH inicial de 5,5. O volume de inóculo padronizado foi de 10 mL e o volume de meio de 90 mL conforme descrito por Cunha et. al. (2012).

O crescimento celular e a produção do exopolissacarídeo foram monitorados ao longo da fermentação, sendo coletadas amostras a cada 24 horas de cultivos. O teor de açúcares totais foi determinado pelo método fenol sulfúrico. Os parâmetros fermentativos rendimento em lasiodiplodana e biomassa micelial, rendimento específico, produtividade volumétrica e consumo de substrato foram determinados conforme descrito por Cunha et. al. (2012).

Caracterização da lasiodiplodana: Micrografias com amplitudes de 60 X, 200 X, 800 X e 1500 X foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura de bancada modelo TM3000 (Hitachi, USA). Os espectros de infravermelho (FTIR) da lasiodiplodana foram gerados em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, USA) na região de 4000-400 cm-1, com 32 acumulações e resolução de 4 cm-1, usando o método ATR. O perfil difratométrico das amostras foi obtido em difratômetro de raio X modelo XDR-6000 (Shimadzu, USA) (Kagimura *et at* 2015). O perfil termogravimétrico foi obtido utilizando equipamento analisador térmico SDT Q600 (TA instruments, EUA). A perda de massa foi acompanhada entre 26 °C e 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e ar sintético com fluxo de 50 ml min^{-1}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos das fermentações conduzidas com 20 g L^{-1} de concentração inicial de açúcares totais.

Parâmetros fermentativos	72 horas*	96 horas*	72 horas&	96 horas&
P_F (g L^{-1})	0,36	0,28	0,56	0,80
P_X (g L^{-1})	2,46	3,02	10,72	10,32
$Y_{P/S}$ (g g^{-1})	0,02	0,01	0,02	0,02
$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	0,14	0,16	0,34	0,29
Y_C (%)	89,17	93,79	79,85	88,85
Ye	0,15	0,09	0,05	0,08
Q_X (g $L.h^{-1}$)	0,03	0,03	0,15	0,11
Q_S (g $L.h^{-1}$)	0,25	0,2	0,44	0,37
Q_P (g $L.h^{-1}$)	0,01	0,003	0,01	0,01
Açucar total residual (g L^{-1})	2,17	1,24	8,06	4,46
pH	5,63	5,39	5,39	5,45

P_F: produção de lasiodiplodana, P_X: produção de biomassa micelial, $Y_{P/S}$: conversão dos açúcares em lasiodiplodana, $Y_{X/S}$: conversão dos açúcares em biomassa micelial, Ye: rendimento específico, Yc percentual de consumo de substrato, Q_P: produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q_X: produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S: taxa global de substrato consumido. Fermentações conduzidas em *20 g L^{-1} e &40 g L^{-1} de concentração inicial de açúcares totais.

Fonte: Autoria Própria (2019).

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

Em relação as fermentações usando 40 g L^{-1} de substrato, o fungo produziu um conteúdo três vezes superior de lasiodiplodana (0,8 gL^{-1}). Da mesma forma, o aumento da concentração inicial do substrato também contribuiu para maior crescimento micelial (10,32 g L^{-1}). O substrato foi efetivamente assimilado em 96h de cultivo, onde foi verificado consumo de 88,85% (Y_C) do substrato. Os maiores valores de rendimento em EPS ($Y_{P/S}$) foram encontrados entre 48 e 96 horas (0,02 g g^{-1}).

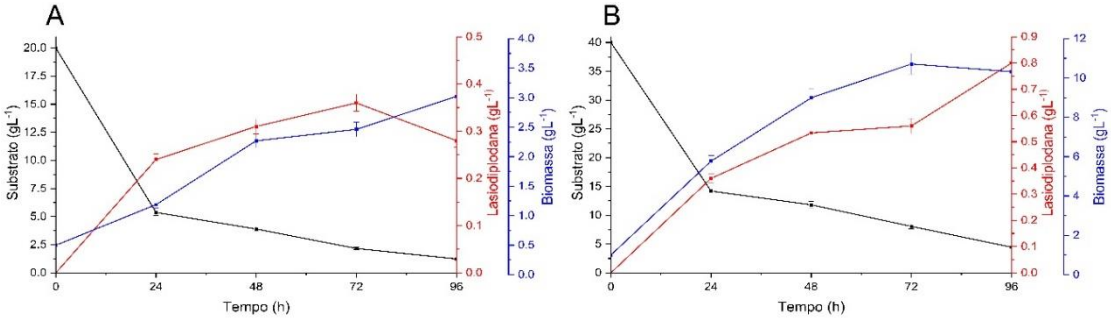
Produtividades volumétricas em biomassa micelial ($Y_{X/S}$) superiores foram encontradas ao longo da fermentação utilizando 40 g L^{-1} quando comparadas aos cultivos onde foram utilizados 20 g L^{-1} de concentração inicial de substrato. O valor máximo de $Y_{X/S}$ foi de 0,34 g g^{-1} em 72 horas de cultivo. Similarmente, o aumento da concentração inicial do substrato também contribuiu para maior assimilação dos açúcares do meio (Q_P).

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

Conforme pode ser observado na Figuras 1 o fungo *L. theobromae* MMPI mostrou elevado potencial de assimilação de substrato nas duas condições de cultivo (20 e 40 g L^{-1}), sendo observado consumo quase completo do substrato nos dois casos. Para a fermentação com meio de cultivo de 20 g L^{-1} a máxima produção de lasiodiplodana foi observado em 72 horas, havendo uma queda após esse período de tempo. Essa pequena redução no conteúdo

de lasiodiplodana após as 72 horas está associada a possível produção de (1→6)-β-D-glucanase, como já descrito por Cunha et al. (2012). Comportamento diferente em relação a produção de EPS, entre 72 e 96 horas, foi verificado nos cultivos com maior conteúdo inicial de substrato, sendo verificado um aumento de produção de EPS (43%) entre 72 horas (0,56 g L^{-1}) e 96 horas (0,8 g L^{-1}). Possivelmente maiores concentrações de substrato podem ter inibido a síntese e/ou a atividade catalítica da (1→6)-β-D-glucanase.

Figura 1 - Perfil da fermentação do melaço de soja com A) concentração de 20 g L^{-1} E B) concentração de 40 g L^{-1}.



Fonte: Autoria Própria (2023).

Caracterização da lasiodiplodana por Microscopia Eletrônica de Varredura: Na figura 2 estão demostradas as micrografias da lasiodiplodana obtidas em meio com 20 g L^{-1} de substrato (LAS-20) e 40 g L^{-1} (Las-40), nas amplitudes de 60 X, 200 X, 800 X e 1500 X.

Figura 2 - Micrografias do exopolissacarídeo obtido em meio a base de melaço de soja.

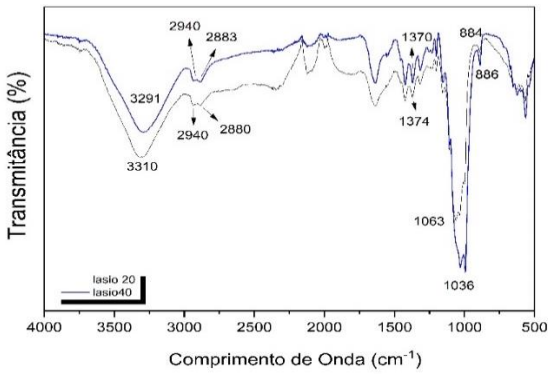
Lasio-20 em amplitudes de 20X (A), 200X (B), 800X (C) e 1500X (D). Lasio-40 em amplitudes de 20X (E), 200X (F), 800X (G), 1500X (H).
Fonte: Autoria Própria (2019).

As amostras apresentaram estruturas superficiais na forma de filmes finos com aspecto translúcido, com superfícies irregulares contendo regiões lisas e algumas regiões com

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

Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR): Os espectros de FT-IR de Lasio-20 e Lasio-40 estão demostrados na Figura 3. Ambos os espectros foram semelhantes entre si, demostrando sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 e 400 cm^{-1}. As bandas de forte intensidade em 3310 cm^{-1} (Lasio-20) e 3291 cm^{-1} (Lasio-40) são atribuídas às vibrações de alongamento de OH (CALEGARI et al., 2017). As bandas em 2940 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} na amostra Lasio-40 e em 2940 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} na Lasio-20 foram atribuídas ao estiramento C-H sp3.

Figura 3 - Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana obtida a partir de 20 gL^{-1} (Lasio-20) e 40 gL^{-1} (Lasio-40) de substrato.



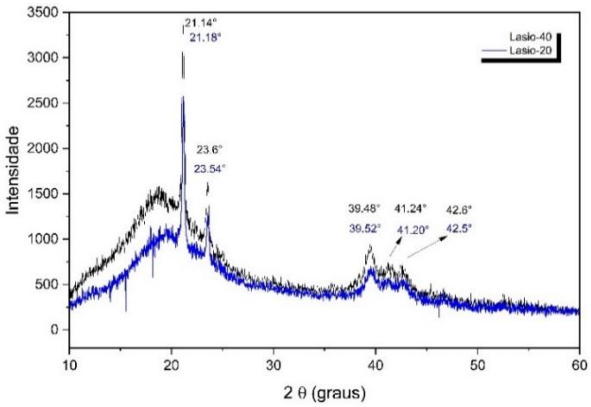
Fonte: Autoria Própria (2019).

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

884 cm^{-1} (Lasio-20) e 886 cm^{-1} (Lasio-40) foram atribuídas a configuração β-glicosidica (THEIS et al., 2019).

Caracterização por Difração de Raios-X: Na Figura 4 está representado o perfil difratométrico dos biopolímeros produzidos. Conforme pode ser verificado o difratograma obtido revela amostras com perfil característico de matriz amorfa, sem predominância de picos agudos. Observa-se dois picos mais pronunciados com valores próximos a 21º e 23º a 2 ϑ. Tais picos indicam que o polissacarídeo estudado apresenta regiões com certa orientação molecular. Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Calegari (2017) e Theis (2017). Picos com menor intensidade foram observados em valores próximos a 39°, 41° e 42°.

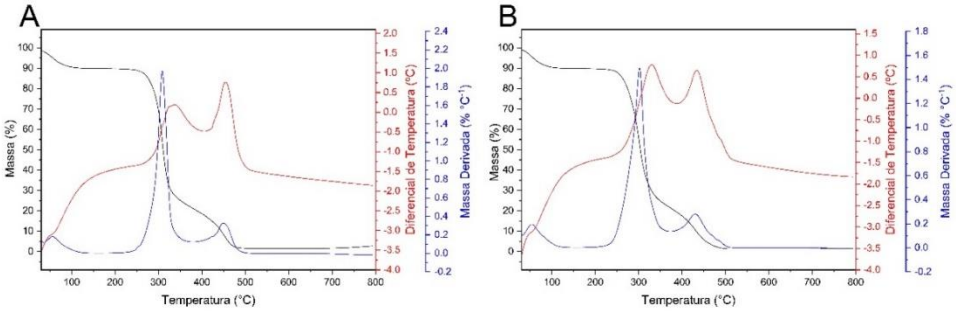
Figura 4 - Difratogramas das amostras de lasiodiplodana produzidas.



Fonte: Autoria própria (2023).

Caracterização por Análise térmica: Na Figura 5 estão apresentados os comportamentos térmicos das amostras de lasiodiplodana, através das curvas TG (termogravimétrica), DTG (termogravimetria derivada) e DTA (térmica diferencial).

Figura **5** - Termograma das amostras de lasiodiplodana A) Las-20 e B) Las-40.



Fonte: Autoria Própria (2019).

Na Figura 5A estão representadas as curvas de perfil térmico da lasiodiplodana produzida na condição de 20 g L^{-1} de concentração inicial de substrato. Pela curva TG são observados três eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu até 130 °C, sendo associada a perda de água de adsorção, e evidenciado pelo pico endotérmico com sutil curvatura em 58,8 °C na curva do DTA. Em seguida ocorre dois eventos consecutivos de perda de massa. O primeiro ocorreu até 327 °C, indicado pelo pico exotérmico em 335 °C e sendo atribuído a degradação da amostra. O seguinte e último evento de perda de massa ocorreu até 489 °C, sendo indicado pelo pico exotérmico em 455 °C na curva DTA e representando a oxidação final da amostra.

Perfil térmico similar foi observado nas amostras de Las-40 conforme verificado no termograma descrito na Figura 5B. Foram observados três eventos de perda de massa, onde o primeiro ocorreu até 115 °C, indicado por um pico endotérmico sutil na curva DTA indicado em 58 °C, e correspondendo a perda de água de hidratação. O segundo evento ocorreu até 319 °C, indicado pelo pico exotérmico em 330 °C na curva DTA e correspondendo a degradação da amostra. O último evento ocorreu até 495 °C, indicado pelo pico exotérmico em 455 °C (curva DTA) e correspondendo a oxidação final da amostra.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

REFERÊNCIAS

ALZORQI, I.; SUDHEER, S.; et al. Ultrasonically extracted β - D - glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, p. 3–5, 2016.

CALEGARI, G. C. ; SANTOS, V. A. Q. ; TEIXEIRA, S. D. ; BARBOSA-DEKKER, A. M. ; DEKKER, R. F. H.; CUNHA M. A. A. Sulfonation of (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan) and its antioxidant and antimicrobial potential. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, v. 5, p. 850-863, 2017.

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

CUNHA MAA, ALBORNOZ SL, QUEIROZ SANTOS VA *et al. Structure and biological functions of d-glucans and their applications*, 1st edn. John Fedor, Amsterdam. (2017).

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

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

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

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

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

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

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