

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus
laurentii* SD7 UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

**CRUZ DAS ALMAS - BA
FEVEREIRO – 2019**

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurentii* SD7 UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso, submetido ao Colegiado de Graduação de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Luciana Cazetta

CRUZ DAS ALMAS – BA

FEVEREIRO - 2019

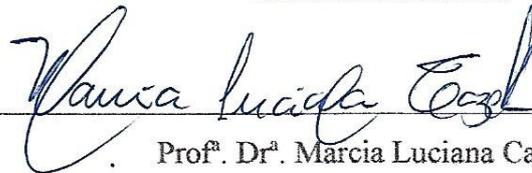
ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurentii*
SD7 UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso homologado pelo Colegiado de Graduação de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), conferindo o título de Bacharel em Biologia.

Aprovado em: ___/___/___

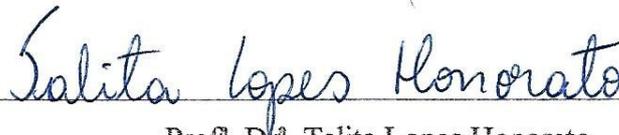
Banca Examinadora



Prof.^a. Dr.^a. Marcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

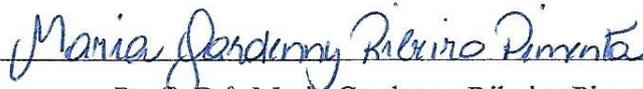
(Orientadora)



Prof.^a. Dr.^a. Talita Lopes Honorato

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

(Membro)



Prof.^a. Dr.^a. Maria Gardenny Ribeiro Pimenta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

(Membro)

CRUZ DAS ALMAS – BA

FEVEREIRO - 2019

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais que me acompanharam durante toda esta jornada, tornando possível a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, que, por vezes, me deu forças para superar todos os desafios ao longo desta caminhada. Sem o seu amor, carinho e proteção nada disso seria possível.

Aos meus pais Cristina e Agnelo por toda a compreensão, amor incondicional e por todas as noites em que passaram acordados ao meu lado me fazendo companhia para que eu permanecesse acordada estudando. Os últimos anos definitivamente não foram fáceis, mas, tendo vocês ao meu lado, pude compreender os reais valores da vida.

Aos meus padrinhos Francis e Nilton por estarem sempre presentes e contribuindo de todas as formas possíveis para que eu atingisse este objetivo. Vocês são os melhores padrinhos que eu poderia ter.

À minha orientadora Prof.^a Dr. Márcia Luciana, pela orientação sem igual, pelos conselhos construtivos, e por exercer, por vezes, o papel de uma segunda mãe.

Aos meus colegas de laboratório: Camila, Taís, Rafael, Jaciara, Gabriel, Cleilton e Peterson por todos os momentos de descontração que tivemos no laboratório e que tornaram de alguma forma, os dias mais agradáveis.

Aos meus velhos amigos: Ruan pelo carinho, por todos os conselhos e por todas as vezes que me incentivou ou me ajudou de alguma forma a resolver os imprevistos que surgiram ao longo de todos esses anos; Bianca por me ouvir e me aconselhar nas horas mais difíceis e por ser a amiga que sempre pedi a Deus; Jucilene pelas experiências que vivemos juntas e por ser tão constante em minha vida, mesmo após tomarmos caminhos tão diferentes; Jonatha pelos momentos de descontração e conselhos construtivos; Adriele por se doar tanto e estar sempre presente quando precisei, ainda que fosse apenas para me ouvir.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura e recursos disponíveis, ao CNPq e FAPESB pela bolsa e recursos concedidos, aos professores e técnicos do Laboratório de Bioquímica e a todos os profissionais envolvidos.

E a todos os outros que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da molécula de xantana (MORRIS; HARDING, 2009).	3
Figura 2: Via metabólica da síntese de EPS por <i>Lactococcus sp.</i> (LOOIJESTEIJN et al., 1999).....	4
Figura 3: Superfície de resposta mostrando a relação entre milhocina e pH na produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7.....	15
Figura 4: Superfície de resposta mostrando a relação entre milhocina e melação na produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7.....	16
Figura 5: Superfície de resposta mostrando a relação entre as variáveis estatisticamente significativas (pH x melação) na produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7.....	17
Figura 6: Produção de EPS (g/L) em função da variação da concentração de melação de cana-de-açúcar. Letras iguais indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade para o teste de Scott-Knott.....	19
Figura 7: Relação entre o tempo de cultivo e os valores de EPS produzidos.	20
Figura 8: Relação entre o tempo de cultivo e os valores de massa seca produzida.	20
Figura 9: Relação entre a variação do pH do meio ao longo do tempo.As barras que apresentam letras iguais indicam que tais médias não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade para o teste de Scott-Knott.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do melação de cana-de-açúcar.....	9
Tabela 2: Composição química da milhocina	10
Tabela 3: Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 para produção do EPS utilizando melação de cana-de-açúcar, pH e milhocina como variáveis, em fermentação submersa.	11
Tabela 4: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 com as variáveis codificadas e decodificadas.	12
Tabela 5: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 e valores das variáveis independentes (X_1 : melação de cana-de-açúcar, X_2 : pH e X_3 : milhocina) e as respostas (produção de EPS em g/L) por <i>C. laurentii</i> SD7 em fermentação submersa.	15
Tabela 6: Análise de regressão da produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7 em fermentação submersa utilizando apenas as variáveis que foram significativas (melação de cana-de-açúcar e pH).	18
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para a produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7 em fermentação submersa utilizando melação de cana-de-açúcar, pH e milhocina como variáveis.....	18

Silva, Adriele do Amor Divino, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Fevereiro 2019, PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurentii* SD7 UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS, Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Luciana Cazetta

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros extracelulares produzidos por microrganismos e que se encontram ligados à parede celular ou excretados no meio extracelular em forma de muco, podendo ser percebidos pelo aumento da viscosidade do meio de cultivo. Os EPS possuem aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, entre outras, devido às suas propriedades físico-químicas. Entretanto, o elevado custo de produção dos EPS tem levado a pesquisas com a utilização de substratos alternativos, especialmente renováveis e de origem agroindustrial. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de EPS pela levedura *Cryptococcus laurentii* SD7 utilizando subprodutos agroindustriais. Para isso, foram realizados ensaios fermentativos utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ para otimizar o processo de produção do EPS em diferentes concentrações de melão de cana-de-açúcar e milhocina, com variação do pH, durante 48 horas. Após isso, foram realizados ensaios fermentativos para a análise da produção de EPS, crescimento celular e variação do pH do meio nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. De acordo com os resultados, a maior produção de EPS ocorreu no pH inicial de 5 e concentração de melão de cana-de-açúcar 8,4%, sendo estas as variáveis estatisticamente significativas ao nível de 10% de significância. A concentração de milhocina não apresentou influência na faixa estudada, sendo possível utilizar a menor concentração (0,3%). Embora o crescimento celular tenha atingido o seu máximo em 48 horas, a maior produção de EPS (6,61 g/L) ocorreu no tempo de 168 horas, com uma produtividade de cerca de 0,04 g/ L/h e o pH do meio permaneceu aproximadamente constante ao longo do processo fermentativo. Assim, podemos concluir que a levedura apresentou elevada produção de EPS e a utilização do melão de cana-de-açúcar e da milhocina como substratos se mostrou bastante promissora

Palavras chave: Carboidratos, fungos, melão de cana-de-açúcar, milhocina.

Silva, Adrielle do Amor Divino, Federal University of the Recôncavo of Bahia, February 2019, PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES BY YEAST *Cryptococcus laurentii* SD7 USING AGROINDUSTRIAL BYPRODUCTS, Advisor: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Luciana Cazetta

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are extracellular biopolymers produced by microorganisms that are bound to the cell wall or excreted in the form of mucus extracellular medium and can be perceived by increasing the viscosity of the culture medium. EPS has applications in the pharmaceutical, cosmetics, food industry, among others, due to its physicochemical properties. However, the high cost of production of EPS has led to research using alternative substrates, especially renewable and agroindustrial. In this way, this work had as objective to study the production of EPS by yeast *Cryptococcus laurentii* SD7 using agroindustrial byproducts. For this, fermentation tests were carried out using the rotational central composite (DCCR) 2³ design to optimize the EPS production process in different concentrations of sugarcane molasses and corn steep liquor, with pH variation, for 48 hours. After that, fermentation assays were performed for EPS, cell growth and pH variation of the medium at 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours. According to the results, the highest EPS production occurred at the initial pH of 5 and sugarcane molasses concentration 8.4%, with the variables being statistically significant at the 10% level of significance. The corn steep liquor concentration had no influence on the studied range, and it was possible to use the lowest concentration (0.3%). Although cell growth reached its maximum in 48 hours, the highest production of EPS (6.61 g / L) occurred in the time of 168 hours, with a yield of about 0.04 g / L / h and pH of the medium remained constant throughout the fermentation process. Thus, we can conclude that the yeast presented high EPS production and the use of sugarcane molasses and corn steep liquor as substrates proved to be very promising

Key words: Carbohydrates, fungi, sugarcane molasses, corn steep liquor

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Polissacarídeos e exopolissacarídeos	2
2.2 Microrganismos produtores de EPS	5
2.3 Principais fatores que influenciam a produção de EPS em leveduras	6
2.3.1 Fonte de carbono	6
2.3.2 Fonte de nitrogênio.....	6
2.3.4 Microelementos	7
2.3.5 Agitação	7
2.3.6 Temperatura e pH.....	7
2.4 Substratos agroindustriais para produção de EPS.....	8
2.4.1 Melaço de cana-de-açúcar	9
2.4.2 Milhocina	9
3.0 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos específicos	10
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR 2^3).....	11
4.1.2 Microrganismo	11
4.1.3 Preparo do inóculo	11
4.1.4 Condições para a fermentação.....	11
4.1.5 Determinação do teor de EPS.....	12
4.1.6 Análise dos resultados.....	12
4.2 Validação	13
4.3 Análise da influência de diferentes tempos de cultivo	13
4.3.1 Microrganismo	13
4.3.2 Condições para a fermentação.....	13
4.3.3 Determinação do teor de EPS.....	14
4.3.4 Análise do crescimento celular	14
4.3.5 Análise do pH.....	14

4.3.6 Análise dos dados utilizando a estatística	14
5.0 RESULTADOS	14
5.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR 2^3).....	14
5.2 Validação	18
5.3 Influência do tempo na produção de EPS	19
6.0 DISCUSSÃO	21
7.0 CONCLUSÃO	24
8.0 REFERÊNCIAS	24

1.0 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são polímeros de açúcares produzidos por animais, plantas, algas marinhas e microrganismos (SILVA et al., 2006; ÖZCAN; ÖNER, 2015). No entanto, a produção, em escala industrial, por plantas e algas ainda apresenta algumas dificuldades, tendo em vista que estes organismos estão expostos a alterações climáticas, contaminação ambiental e problemas na colheita que dificultam muito o processo de obtenção dos polissacarídeos (DONOT et al., 2012; ÖZCAN; ÖNER, 2015). Em contrapartida, a produção por microrganismos não está exposta a estes problemas, uma vez que, eles podem ser facilmente cultivados em laboratório. Além disso, seu ciclo de vida permite a obtenção de tais moléculas em um período de apenas alguns dias (SILVA et al., 2006; ÖZCAN; ÖNER, 2015).

Os polissacarídeos sintetizados pelos microrganismos podem ser encontrados no citoplasma celular, sendo utilizados como reserva energética; na parede celular sendo um dos componentes responsáveis pela morfologia da célula; e podem ser secretados no meio extracelular, sendo denominados exopolissacarídeos ou Extracellular Polymeric Substances (EPS) (KUMAR et al., 2007). Os EPS podem estar ligados a célula formando uma cápsula ou podem ser secretados no meio extracelular em forma de limos, sendo percebidos pela viscosidade do meio fermentativo (KUMAR et al., 2007).

Embora não sejam essenciais para a sobrevivência, os EPS fornecem aos microrganismos proteção contra fagocitose, estresse osmótico, dessecação, favorecem a formação de biofilmes e muitos estão associados à virulência, como é caso de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, as quais vêm sendo descritas como causadoras de patogenicidade em plantas, sob a condição de produção de EPS (DENNY, 1995; PRASANNATH, 2013). Dessa forma, podem ser consideradas moléculas que são sintetizadas frente alguma condição adversa do meio (KUMAR et al., 2007; GIENKA et al., 2015).

Muitas são as pesquisas que visam a produção de EPS em escala industrial, tendo em vista suas diversas aplicações nos setores industriais, farmacêuticos e na área médica (PAVLOVA et al., 2011; GIENKA et al, 2015; ZHOU et al, 2016; SARDARI et al, 2017). No entanto, o custo-benefício desses bioprocessos ainda se constitui um problema, uma vez que alguns microrganismos não produzem EPS em quantidades satisfatórias e as fontes de carbono tradicionais utilizadas, como glicose e sacarose,

apresentam custo elevado (RUIZ et al., 2015). Em função disso, têm surgido diversas pesquisas que visam à utilização de substratos agroindustriais para a produção de biomoléculas de interesse como os EPS (SANTOS et al., 2012; RUIZ et al., 2015; SANTOS et al., 2018). A utilização desses substratos se apresenta uma alternativa sustentável, uma vez que, além de agregar valor a subprodutos agroindustriais que muitas vezes são descartados, pode reduzir os problemas de contaminação ambiental (SANTOS et al., 2012; RUIZ et al., 2015).

O melaço de cana-de-açúcar e a milhocina são substratos agroindustriais que apresentam potencial para serem utilizados nestes bioprocessos, pois contém em sua composição açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos que podem substituir perfeitamente a utilização das fontes convencionais (REBELATO et al., 2013; SAXENA; TANNER, 2012).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polissacarídeos e exopolissacarídeos

Os polissacarídeos são biomoléculas de cadeias longas (compostas por mais de dez unidades de monômeros) e que podem ser encontradas em muitos organismos (SILVA et al., 2006; HUSSAIN et al., 2017). Esses biopolímeros de açúcares são formados por várias unidades de monossacarídeos, que se unem por meio vários tipos de ligações glicosídicas (SILVA et al., 2006; HUSSAIN et al., 2017). Eles podem ser classificados em heteropolissacarídeos, quando são compostos de unidades distintas de monômeros, ou homopolissacarídeos quando apresentam um único tipo de monômero em sua constituição (SILVA et al., 2006; DONOT et al., 2012). Os polissacarídeos diferenciam-se entre si devido as variações nos tipos de ligações entre os monossacarídeos, no comprimento da cadeia, na ramificação e nos tipos de monossacarídeos que os compõe (SILVA et al., 2006; HUSSAIN et al., 2017).

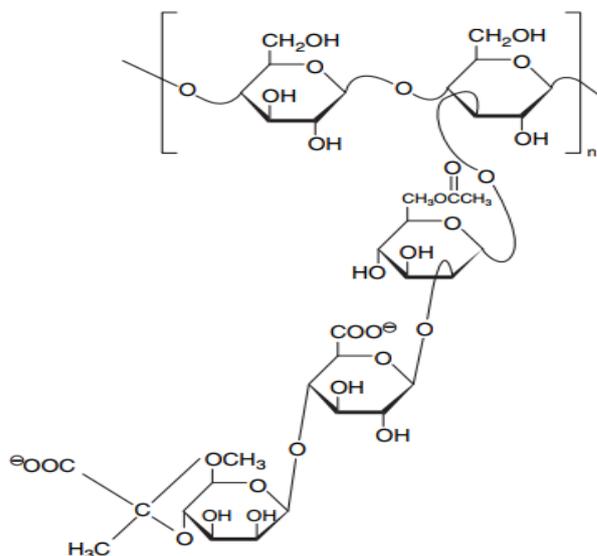
Alguns polissacarídeos podem ser obtidos a partir de algas marinhas, plantas e microrganismos, no entanto, a produção por meio de algas e plantas em grande escala é um processo lento e que pode ser dificultado por alguns fatores como, por exemplo, condições climáticas e o tempo de desenvolvimento (DONOT et al., 2012; ÖZCAN; ÖNER, 2015). Em contrapartida, a produção de polissacarídeos por microrganismos é muito desejada porque as condições químicas e físicas dos processos fermentativos, necessários à síntese dessas biomoléculas microbianas, podem ser controladas em

laboratório de acordo com a exigência de cada microrganismo e a produção é alcançada entre dias a semanas, graças ao seu ciclo de vida curto (SILVA et al., 2006; ÖZCAN; ÖNER, 2015).

Os biopolímeros produzidos por microrganismos podem ser classificados em intracelulares, que são aqueles que estão localizados no citosol e desempenham as mais variadas funções dentro da célula; os polissacarídeos estruturais são aqueles presentes na parede celular, fazendo parte da estrutura da célula; e aqueles extracelulares, também chamados de exopolissacarídeos (EPS). Estes últimos podem estar ligados firmemente à superfície da célula microbiana, sendo denominados como cápsula, ou podem ser totalmente excretados no meio extracelular sendo percebidos pelo aumento da viscosidade do meio (BARBOSA et al., 2004; DONOT et al., 2012). Os EPS oferecem para a célula microbiana proteção contra fagocitose por protozoários, dessecação, proteção contra estresse osmótico, seletividade à difusão de nutrientes para o interior ou exterior da célula e, ainda, proteção contra alguns antibióticos (KUMAR et al., 2007; ÖZCAN; ÖNER, 2015). Alguns trabalhos classificam os EPS como metabolitos secundários, uma vez que estes não são considerados essenciais às funções básicas de uma célula, como o crescimento (GIENKA et al., 2015). O grande interesse acerca da otimização da produção microbiana de EPS vem crescendo a cada dia devido às suas diversas aplicações em diferentes setores industriais, pois os EPS podem ser utilizados como emulsificantes, espessantes, estabilizantes e geleificantes na indústria de alimentos e, no setor farmacêutico, são descritas propriedades antitumorais, antiolesterolêmicas e anticoagulantes de muitos EPS microbianos (PAVLOVA et al., 2011; GIENKA et al., 2015; ZHOU et al., 2016; SARDARI et al., 2017).

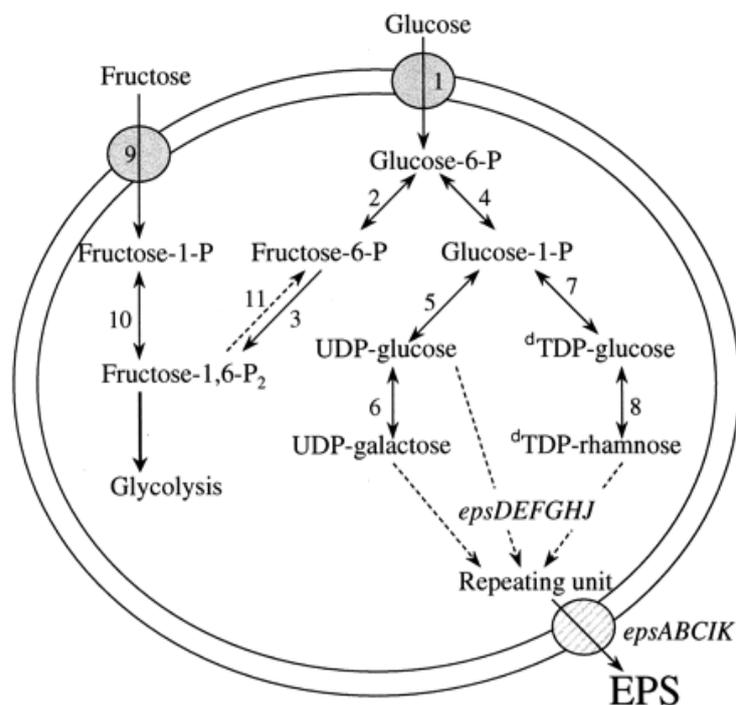
O primeiro exopolissacarídeo microbiano produzido comercialmente foi a dextrana, produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (KUMAR et al., 2007). Atualmente, dezenas de EPS microbianos são comercializados como a gelana, cardulana, com destaque para a xantana (Figura 1), produzido especialmente por *Xanthomonas campestris* (KUMAR et al., 2007; FREITAS et al., 2017).

Figura 1: Estrutura molecular da molécula de xantana (MORRIS; HARDING, 2009).



A rota de biossíntese dos EPS varia de acordo com a fonte de carbono fornecida, bem como com o tipo microrganismo, podendo ser produzido por bactérias e fungos (NOUHA et al., 2017). No entanto, as etapas básicas similares para todos os microrganismos envolvem assimilação e conversão dos açúcares em precursores para a síntese de EPS, a polimerização dos precursores e a transferência destes polímeros até a membrana plasmática para posterior secreção (Figura 2). Todo esse processo é coordenado por uma série de enzimas (NOUHA et al., 2017).

Figura 2: Via metabólica da síntese de EPS por *Lactococcus sp.* (LOOIJESTEIJN et al., 1999).



2.2 Microrganismos produtores de EPS

Os primeiros microrganismos a serem estudados como produtores de EPS foram as bactérias, e, entre elas, as que apresentam maior potencial para produção, de acordo com a literatura, são *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus* sp., *Zymonas mobilis* (DONOT et al., 2012). Posteriormente começaram os estudos com fungos filamentosos e, atualmente, a literatura descreve *Aureobasidium pullulans* como sendo uma espécie bastante promissora para a obtenção destas biomoléculas (BARBOSA et al., 2004; RAVELLA et al., 2010).

Os estudos utilizando leveduras para a produção de EPS ainda são relativamente poucos quando comparados com os estudos que utilizam bactérias ou fungos filamentosos. No entanto, alguns trabalhos já mostram que algumas leveduras como as dos gêneros *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Bullera*, *Aureobasidium* e *Sporobolomyces* apresentam um elevado e promissor potencial para essa produção (PAVLOVA et al., 2004; PAVLOVA et al., 2011).

Cryptococcus laurentii é uma espécie de levedura que vem sendo descrita como produtora de EPS, e, isso pode ser facilmente observado devido à presença de cápsulas ao redor da célula, conferindo-lhe a característica de viscosidade (CAPEK et al., 2008; PAVLOVA et al., 2011; SMIRNOU et al., 2014). O EPS produzido pela levedura *C. laurentii* foi caracterizado por Pavlova et al. (2011) e apresentou em sua composição cerca de 79,1% de carboidrato, 11,7% de proteína e 9,2 % de cinzas. A porção glicídica do EPS apresentou os monossacarídeos arabinose, manose, glicose, galactose e ramnose, quando foi fornecida como fonte de carbono a sacarose. No entanto, alguns outros trabalhos com esta mesma espécie mostraram que, a composição do EPS pode variar de acordo com a fonte de carbono fornecida, podendo, por exemplo, haver a presença de ácido glicurônico (SMIRNOU et al., 2014).

A composição dos EPS produzidos por fungos filamentosos e por bactérias é muito semelhante aos produzidos pelas leveduras e parece estar mais relacionada com a fonte de carbono fornecida (ZHOU et al., 2016; MOGHANNEM et al., 2018).

2.3 Principais fatores que influenciam a produção de EPS em leveduras

2.3.1 Fonte de carbono

A fonte de carbono é utilizada pelos microrganismos para gerar energia para seu crescimento por meio da quebra das ligações de carbono nas moléculas e, além disso, durante o processo fermentativo os microrganismos também podem utilizar as fontes de carbono disponíveis como precursores para a síntese de biomoléculas como os EPS (BARBOSA et al., 2004).

Além disso, deve-se ressaltar que a fonte de carbono que é fornecida está diretamente relacionada com a composição monossacarídica do EPS produzido (CUNHA et al., 2008).

Para as leveduras, algumas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de encontrar fontes de carbono mais eficientes para a produção dos EPS. Entre as fontes de carbono mais utilizadas, geralmente, as que se destacam são glicose e sacarose (PAVLOVA et al., 2009; GIENKA et al., 2016). Além disso, a concentração da fonte de carbono é outro fator que tem grande influência nos rendimentos de EPS (HEREHER et al., 2018). No entanto, a maioria dos trabalhos para leveduras já iniciam com concentrações fixas de fonte de carbono, que variam entre 4,0 a 5,0 % (PAVLOVA et al., 2009; GIENKA et al., 2016).

2.3.2 Fonte de nitrogênio.

As fontes de nitrogênio orgânicas mais descritas na literatura para o processo de produção de EPS são o extrato de levedura e a peptona e a inorgânica é o sulfato de amônio (CHO et al., 2001; BARBOSA et al., 2004; SONG et al., 2013). Alguns trabalhos têm mostrado que condições limitantes de fonte de nitrogênio no meio de cultivo estimulam a produção do EPS e, em contrapartida, quando presente em grande quantidade, pode reduzir muito a produção do mesmo (CHO et al., 2001; BARBOSA et al., 2004). Cho et al. (2001) demonstraram nos resultados obtidos, que, quando a relação C:N era superior a 15 a produção de EPS rapidamente decrescia e era produzido em grande quantidade um lipídeo extracelular. Esses mesmos autores sugeriram que isso ocorre pois, provavelmente, relações mais altas de C:N alteram as vias metabólicas para a síntese de lipídeos reduzindo assim a síntese de EPS.

2.3.4 Microelementos

Os microelementos são sais inorgânicos utilizados em pequena quantidade devido à manutenção osmótica intracelular. Alguns desses elementos têm papel fundamental em bioprocessos, uma vez que podem atuar como cofatores enzimáticos ou fazem parte da composição de algumas moléculas (SEVIOR et al., 1992; BARBOSA et al., 2004). Entre as fontes mais utilizadas podemos citar o sulfato de magnésio e o cloreto de sódio (SEVIOR et al., 1992; BARBOSA et al., 2004).

2.3.5 Agitação

A produção de EPS em meio de cultivo submerso reflete, geralmente, um aumento da viscosidade do meio ao longo do tempo, que se deve às características reológicas destas biomoléculas (BARBOSA et al., 2004). Este fator implica na dificuldade de distribuição de oxigênio e nutrientes ali presentes. Desta forma a agitação tem um papel muito importante, uma vez que a mesma facilita a distribuição, para as células, de tais componentes no meio. A maioria dos trabalhos descritos na literatura utilizam rotações que variam entre 200 a 250 rpm (GIENKA et al., 2016; PAVLOVA et al., 2011). Alguns autores sugerem que com o aumento de rotações por minuto (rpm) a produção de EPS aumenta significativamente, desde que a quantidade de oxigênio dissolvida seja controlada (BARBOSA et al., 2004).

2.3.6 Temperatura e pH

A temperatura é um dos fatores físicos mais importantes na produção do EPS, uma vez que irá influenciar na atividade das enzimas que participam desse processo. Segundo Kumar et al. (2007) as melhores temperaturas para a produção de EPS geralmente são temperaturas de incubação abaixo daquela ideal para o crescimento celular. Sutherland (1972) propôs um mecanismo que explica que uma diminuição na temperatura provoca uma redução do crescimento microbiano e, com isso, mais precursores são direcionados para a produção de EPS ao invés de serem direcionados para o crescimento celular.

Segundo Fang et al. (2002) o pH inicial pode afetar a morfologia da célula, a solubilidade dos sais presentes no meio de cultura e a atividade das enzimas do microrganismo estudado, afetando, indiretamente a síntese do metabólito. Assim o pH ótimo para o crescimento é também aquele mais adequado para a produção do EPS (KUMAR et al., 2007).

2.4 Substratos agroindustriais para produção de EPS

O Brasil apresenta uma economia fortemente atrelada à agricultura e agropecuária e, como resultado disso, é gerado também uma grande quantidade de resíduos, sólidos ou líquidos (BERNARDES et al., 2014). Esses resíduos podem ser classificados de duas formas distintas: aqueles que são gerados no momento do consumo, como é o caso de frutas e verduras, e que estão distribuídos entre os centros urbanos e os resíduos agroindústrias, gerados no momento do processamento da matéria-prima, sendo que estes últimos resultam em volumes muito grandes de biomassa (WOICIECHOWSKI et al., 2013). Logo, esses resíduos podem acabar sendo depositados no meio ambiente causando diversos problemas no próprio local onde é depositado e em outras localidades, uma vez que, com a chuva, acabam sofrendo lixiviação e terminam por poluir, além dos solos, os corpos hídricos (PANDEY et al., 2000).

Tanto os resíduos orgânicos quanto os inorgânicos são considerados poluidores, já que tudo que é incorporado ao solo ou corpos hídricos, e que não são comuns a eles (em termos de qualidade ou quantidade), possuem a capacidade de alterar significativamente a estrutura física e química desses ambientes, o que pode afetar todo o ecossistema (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Entretanto, os resíduos agroindustriais são considerados uma ótima fonte de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas e, por apresentarem esta propriedade, podem ser empregados em bioprocessos para a obtenção de biomoléculas de interesse biotecnológico e industrial (ZIHARE et al., 2018). Além disso, pelo fato de possuírem baixo valor econômico, podem ser uma alternativa de menor custo aos substratos tradicionais (BERNARDES et al., 2014). Ao mesmo tempo, o direcionamento para estes bioprocessos reduz a deposição de tais compostos no meio ambiente, o que contribui muito para a diminuição de problemas de contaminação ambiental (PANDEY et al., 2000). No entanto, apesar de apresentar diversas vantagens, a utilização de tais resíduos apresenta a desvantagem de apresentar baixa padronização da sua composição. Isso ocorre devido às flutuações climáticas e as condições de cultivo que geram variação na composição dos produtos agrícolas, a partir das quais estes resíduos são gerados. Para alguns destes resíduos que são gerados de forma concentrada existem diversos direcionamentos que os tornam valoráveis. Assim, eles passam a ser encarados como subprodutos (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

2.4.1 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar, um líquido viscoso e escuro, é um subproduto gerado durante o processo de cristalização do açúcar (SOUKOULIS; TZIA, 2018). Estima-se que a cada ano são geradas toneladas de melaço e este por sua vez possui um elevado potencial para a aplicação em bioprocessos, uma vez que, possui em sua composição açúcares, nitrogênio, vitaminas e minerais (Tabela 1), capazes de fornecer um ambiente propício para os microrganismos sintetizarem biomoléculas de interesse industrial (LI et al., 2015; XU et al., 2015). Além disso, o melaço de cana-de-açúcar pode ser empregado como substrato em bioprocessos que exigem a manutenção de pH do meio de cultivo, uma vez que os aminoácidos presentes em sua composição apresentam efeito tamponante (DUMBREPATIL et al., 2008).

Tabela 1: Composição química do melaço de cana-de-açúcar

Composição	Concentração (%)
Nitrogênio	0,58 p/v
Fosforo	0,015 p/v
Potássio	1,63 p/v
Umidade	9,10 p/p
Cinzas	9,98 p/p
Glicídios redutores em glicose	14,72 p/p
Glicídios não redutores em sacarose	33,78 p/p

Fonte: Feltrin et al. (2000)

Na literatura, o melaço é descrito como substrato para produção de diversas substâncias como o ácido lático ou ácido succínico, etanol, entre outros (DUMBREPATIL et al., 2008; XU; XU, 2014; XU et al., 2015). Porém, existem poucos trabalhos que descrevem o emprego deste subproduto para a produção de EPS por leveduras (GRIGOROVA et al., 1999; SIRAJUNIZA et al., 2012).

2.4.2 Milhocina

A milhocina é um líquido viscoso, subproduto proveniente do processamento do milho, e que possui em sua composição grande porcentagem de proteína, entre outros componentes (Tabela 2), atuando como uma ótima fonte de nitrogênio que pode ser utilizada pelos microrganismos em bioprocessos (SAXENA; TANNER, 2013). A utilização da milhocina vem sendo bastante empregada em processos fermentativos

devido ao seu baixo custo, quando comparada a fontes convencionais de nitrogênio como o extrato de levedura e peptona. No entanto a sua utilização em processos de produção de EPS ainda é pouco descrita na literatura (SHARMA et al., 2013).

Tabela 2: Composição química da milhocina

Componentes	Concentração (%)
Matéria seca	50
Proteína	40
Cinzas	10
Extrato de nitrogênio	16
Ácido láctico	21
pH	3.7

Fonte: Mirza; Mushtaq (2006)

Desta forma, pesquisas que visem a bioprospecção de microrganismos produtores de EPS, bem como a utilização de subprodutos de origem agroindustrial, para a otimização deste processo, pode ser uma alternativa altamente sustentável e válida para alcançar a produção destas biomoléculas, em escala industrial (XU et al., 2015).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir exopolissacarídeos por *Cryptococcus laurentii* SD7 utilizando subprodutos agroindustriais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar como a variação de algumas condições de cultivo afetam a produção de EPS (concentrações de melado de cana-de-açúcar e milhocina em diferentes valores de pH).
- Determinar o melhor tempo de cultivo na produção do EPS.
- Determinar crescimento celular.
- Analisar o comportamento do pH do meio durante a fermentação.
- Analisar os resultados obtidos através de programas estatísticos.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2³ (DCCR 2³) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

4.1.1 Microrganismo

Foi utilizada a levedura identificada como *Cryptococcus laurentii* SD7, que se encontra depositada no acervo do Laboratório de Bioquímica da UFRB.

4.1.2 Preparo do inóculo

O isolado foi incubado em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud e mantido a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Em seguida, foram retiradas duas alçadas de colônias e adicionadas ao meio composto por (%): 0,2 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de KH_2PO_4 ; 0,05 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de CaCl_2 ; 0,01 de NaCl ; 0,1 de extrato de levedura e melão de cana-de- açúcar a 5%. O inóculo foi incubado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com o volume final de 20 mL em agitação de 250 rpm e $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

4.1.3 Condições para a fermentação

A produção de EPS foi realizada por meio do estudo de diferentes condições de cultivo, em fermentação submersa. Para isto foram utilizados 22,5 mL de meio de cultivo composto de (%): KH_2PO_4 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCl_2 0,01; NaCl 0,01, acrescido de 2,5 mL do inóculo, totalizando um volume final de 25 mL, durante 48 horas e em $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação de 250 rpm. Os ensaios fermentativos ocorreram em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de acordo com a matriz de Delineamento Composto Central Rotacional 2³ (DCCR) conforme descrito por Rodrigues e Iemma (2009), e as variáveis estudadas foram a concentração de melão (3 a 7 %), pH (3 a 7) e milhocina (0,3 a 0,7 %), resultando em 17 ensaios (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Delineamento Composto Central Rotacional 2³ para produção do EPS utilizando melão de cana-de-açúcar, pH e milhocina como variáveis, em fermentação submersa

	Variáveis codificadas				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X₁ - Melão (%)	1,6	3	5	7	8,4
X₂ - pH	1,6	3	5	7	8,4
X₃ - Milhocina (%)	0,16	0,3	0,5	0,7	0,84

Tabela 4: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 com as variáveis codificadas e decodificadas para produção do EPS utilizando melão de cana-de-açúcar, pH e milhocina como variáveis, em fermentação submersa

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Melão	pH	Milhocina
				(%)		(%)
1	-1	-1	-1	3	3	0,3
2	1	-1	-1	7	3	0,3
3	-1	1	-1	3	7	0,3
4	1	1	-1	7	7	0,3
5	-1	-1	1	3	3	0,7
6	1	-1	1	7	3	0,7
7	-1	1	1	3	7	0,7
8	1	1	1	7	7	0,7
9	-1,68	0	0	1,6	5	0,5
10	1,68	0	0	8,4	5	0,5
11	0	-1,68	0	5	1,6	0,5
12	0	1,68	0	5	8,4	0,5
13	0	0	-1,68	5	5	0,16
14	0	0	1,68	5	5	0,84
15	0	0	0	5	5	0,5
16	0	0	0	5	5	0,5
17	0	0	0	5	5	0,5

4.1.4 Determinação do teor de EPS

Após 48 horas, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos e a 4 °C para a separação da biomassa e do sobrenadante contendo o EPS. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e mantidos a - 4 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm e 4 °C por 20 minutos para separação do precipitado. Forminhas previamente pesadas foram levadas a estufa a 80 °C contendo o EPS. Posteriormente foi realizada a pesagem para a determinação da produção de EPS em g/L por diferença de massa.

4.1.5 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados por meio do programa Statistica 7, com o objetivo de avaliar quais as variáveis estudadas no processo de otimização foram

estatisticamente significativas na produção de EPS.

4.2 Validação

Após a determinação das variáveis significativas, o meio otimizado para a produção de EPS foi estabelecido variando-se apenas o melaço de cana-de-açúcar. Para isso foi realizada a fermentação submersa da seguinte forma: O isolado foi incubado em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud e mantido a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 48 horas. Em seguida, foram retiradas duas alçadas das colônias e adicionadas ao meio composto por (%): 0,2 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de KH_2PO_4 ; 0,05 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de CaCl_2 ; 0,01 de NaCl ; 0,1 de extrato de levedura e 5 de melaço de cana-de-açúcar. O inóculo foi incubado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com o volume final de 20 mL em agitação de 250 rpm e $25 \pm 2\text{ °C}$ por 24 horas. Em seguida 2,5 mL do inóculo foram adicionados a 22,5 mL do meio contendo (%): KH_2PO_4 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCl_2 0,01; NaCl 0,01; milhocina 0,3. O pH do meio foi ajustado para 5 e a concentração de melaço de cana-de-açúcar variou nas porcentagens de 9, 10, 11 e 12%. A fermentação durou 48 horas, a $25 \pm 2\text{ °C}$ e todos os ensaios foram realizados em triplicata. O processo de recuperação e quantificação do EPS, bem como a análise dos dados, foi semelhante ao processo anteriormente descrito nos itens 4.1.4 e 4.1.5.

4.3 Análise da influência de diferentes tempos de cultivo

4.3.1 Microrganismo

Após a definição do meio de cultivo, a levedura *Cryptococcus laurentii* SD7 foi incubada em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud e mantida a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 48 horas. Em seguida, foram retiradas duas alçadas de colônias e adicionadas ao meio composto por (%): 0,2 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de KH_2PO_4 ; 0,05 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de CaCl_2 ; 0,01 de NaCl ; 0,1 de extrato de levedura e melaço-de-cana de açúcar a 5%. O inóculo foi incubado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, com o volume final de 50 mL, agitação de 250 rpm e $28 \pm 2\text{ °C}$ por 24 horas.

4.3.2 Condições para a fermentação

A produção de exopolissacarídeo foi realizada por meio do estudo de diferentes tempos para fermentação submersa. Para isto foram utilizados 45 mL de meio de cultivo composto de (%): KH_2PO_4 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCl_2 0,01; NaCl 0,01, milhocina

0,3 e melaço 8,4, acrescido de 5 mL do inóculo totalizando um volume final de 50 mL, a 25 ± 2 °C durante 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Os ensaios fermentativos ocorreram em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e foram realizados em triplicata.

4.3.3 Determinação do teor de EPS

A determinação do teor de EPS ocorreu de acordo com o item 4.1.5, previamente descrito.

4.3.4 Análise do crescimento celular

Foram adicionados 50 mL de água destilada à biomassa e esta foi centrifugada a 5000 rpm e 4 °C por 20 minutos. Esse processo foi realizado duas vezes para a lavagem das células. Em seguida a biomassa foi ressuspensa no mesmo volume de água destilada, utilizado previamente, e levadas ao espectrofotômetro para a análise do crescimento celular por meio dos valores obtidos de absorbância a 600 nm. Por meio da fórmula obtida da curva padrão previamente realizada para a levedura *C. laurentii* SD7, os valores foram dados em biomassa (g/L).

4.3.5 Análise do pH

Para a análise do pH das amostras foi utilizado o pHmetro e foram então comparados os valores do pH das amostras ao final de seus respectivos períodos de fermentação com o valor inicial padronizado para todas as amostras.

4.3.6 Análise dos dados utilizando a estatística

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico R para inferir qual foi o tempo de cultivo em que houve maior produção de EPS e, se este diferiu estatisticamente dos outros.

5.0 RESULTADOS

5.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2³ (DCCR 2³)

Os resultados da produção de EPS obtidos utilizando melaço de cana-de-açúcar e milhocina como substratos, após 48 horas de fermentação estão apresentados na Tabela 5. As condições de cultivo onde foram encontradas produções de EPS acima de 2,0 g/L foram as dos ensaios 6, 10, 13 e 17. Esses ensaios apresentaram em comum concentrações de melaço a partir de 5,0 %, de milhocina entre 0,5 e 0,7 % e pH ácido

(entre 3 e 5), com destaque para o ensaio 10 que apresentou a maior produção de EPS, 2,65 g/L.

Tabela 5: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 e valores das variáveis independentes (X_1 : melão de cana-de-açúcar, X_2 : pH e X_3 : milhocina) e as respostas (produção de EPS em g/L) por *C. laurentii* SD7 em fermentação submersa.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais			
	X_1	X_2	X_3	Melão de cana-de-açúcar (%)	pH	Milhocina (%)	Produção de EPS (g/L)
1	-1	-1	-1	3	3	0,3	1,39
2	1	-1	-1	7	3	0,3	1,80
3	-1	1	-1	3	7	0,3	1,14
4	1	1	-1	7	7	0,3	1,55
5	-1	-1	1	3	3	0,7	1,76
6	1	-1	1	7	3	0,7	2,04
7	-1	1	1	3	7	0,7	1,20
8	1	1	1	7	7	0,7	1,70
9	-1,68	0	0	1,6	5	0,5	1,07
10	1,68	0	0	8,4	5	0,5	2,65
11	0	-1,68	0	5	1,6	0,5	1,12
12	0	1,68	0	5	8,4	0,5	1,54
13	0	0	-1,68	5	5	0,16	2,23
14	0	0	1,68	5	5	0,84	1,56
15	0	0	0	5	5	0,5	1,82
16	0	0	0	5	5	0,5	1,88
17	0	0	0	5	5	0,5	2,07

As Figuras 3 e 4 mostram que, quanto maior a concentração do melão de cana-de-açúcar, maior foi a produção de EPS. Para a milhocina, por sua vez, a faixa de concentração estudada não apresentou efeitos significativos, indicando que sua variação não influenciou na produção do EPS, sendo possível, desta forma, trabalhar com a concentração mais baixa deste substrato (Figuras 4 e 5). Com relação ao pH, a máxima produção de EPS ocorreu em pH 5, sendo que acima e abaixo deste valor a produção apresentou diminuição (Figuras 3 e 5).

Figura 3: Superfície de resposta mostrando a relação entre as variáveis estatisticamente significativas (melaço de cana-de-açúcar e pH) na produção de EPS por *C. laurentii* SD7

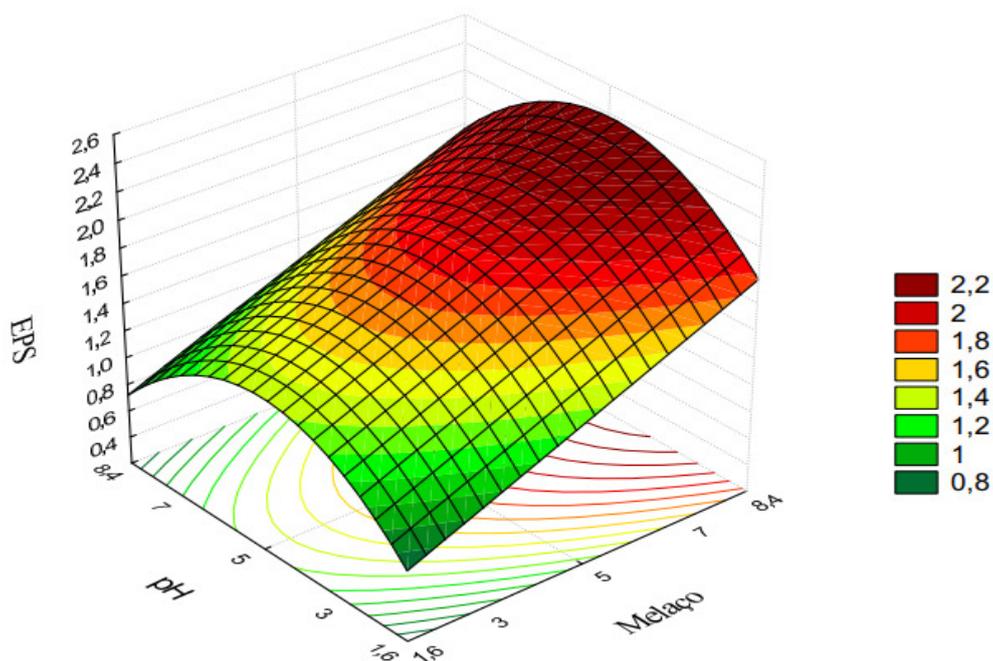


Figura 4: Superfície de resposta mostrando a relação entre o melaço de cana-de-açúcar e a milhocina na produção de EPS por *C. laurentii* SD7.

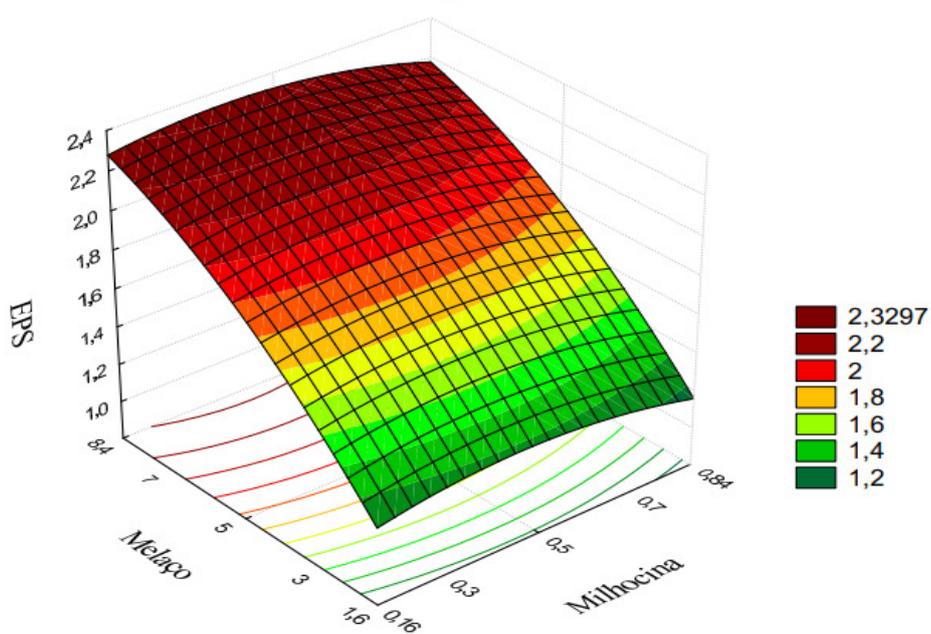
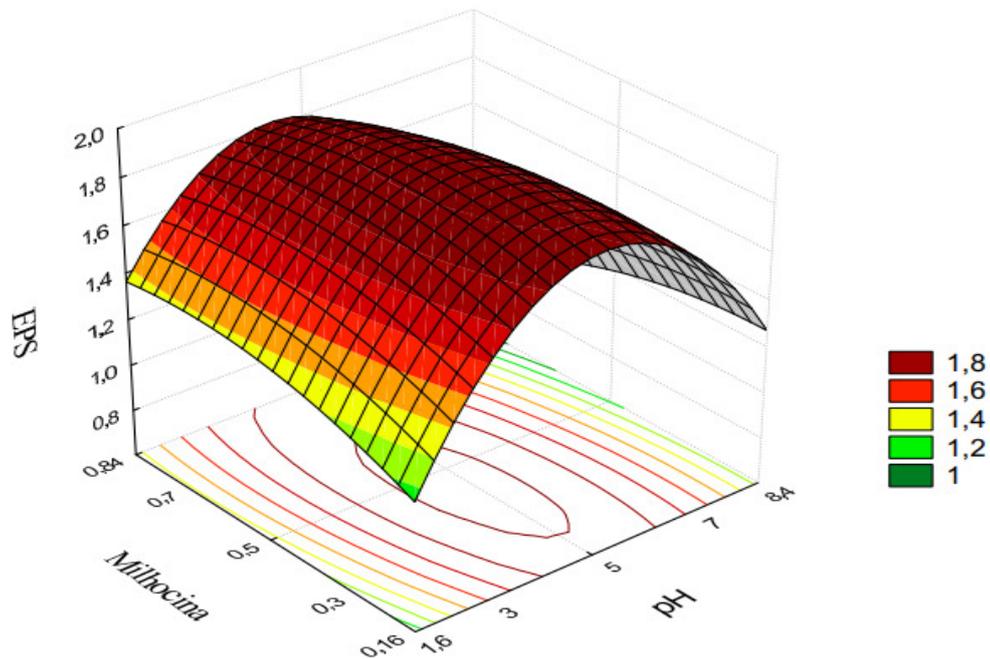


Figura 5: Superfície de resposta mostrando a relação entre o pH e a milhocina na produção de EPS por *C. laurentii* SD7.



A análise dos coeficientes de regressão (Tabela 6) mostram que os únicos fatores que influenciaram na produção de EPS foram a fonte de carbono e o pH, pois foram as únicas variáveis estatisticamente significativas no nível de confiança de 90% ($p < 0,1$). O valor de F_{calc} de 13,2 indica que os resultados foram altamente significativos e a correlação entre os valores preditos e observados foi satisfatória (Tabela 7). Desta forma, pode-se afirmar que os resultados se ajustam bem ao modelo e os valores dos coeficientes de regressão podem ser utilizados para gerar a equação do modelo (Equação 1):

$$\text{EPS (g/L)} = 1,851 + 0,312 X_1 - 0,216 X_2^2$$

(Eq. 1)

Tabela 6: Análise de regressão da produção de EPS por *C. laurentii* SD7 em fermentação submersa utilizando apenas as variáveis que foram significativas (melaço de cana-de-açúcar e pH).

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t(14)	P – valor
Média	1,850771	0,088691	20,86763	0,000000
Melaço (L)	0,311729	0,072908	4,27564	0,000769
pH (Q)	-0,215504	0,074645	-2,88706	0,011943

L=Linear; Q=Quadrático

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para a produção de EPS por *C. laurentii* SD7 em fermentação submersa utilizando melaço de cana-de-açúcar, pH e milhocina como variáveis.

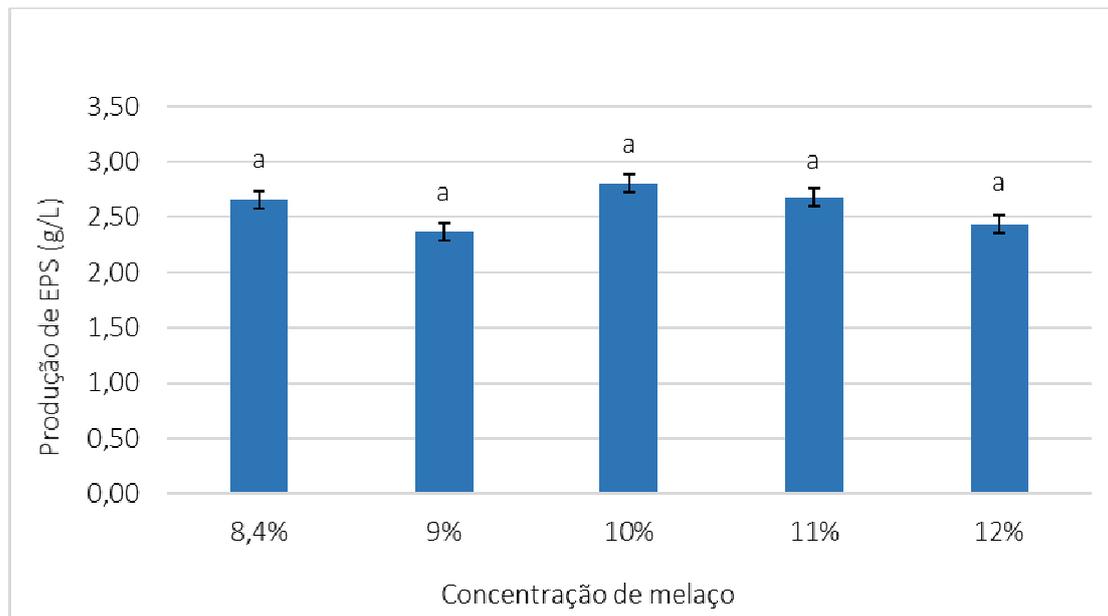
Fatores	GL	SQ	QM	Fc
Regressão	2	1,932	0,966	13,23
Resíduo	14	1,016	0,073	
Total	16	2,948		

F_{tab} : 2,73; significativo ao nível de 10% de significância; GL: Grau de Liberdade; SQ: Soma dos Quadrados; QM: Quadrado médio.

5.2 Validação

Os resultados dos testes de validação mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (Figura 6). Assim, pode-se considerar que a condição de 8,4% de melaço, 0,3% de milhocina e pH 5 foi a melhor para a produção de EPS.

Figura 6: Produção de EPS (g/L) em função da variação da concentração de melão de cana-de-açúcar.



Letras iguais indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade para o teste de Scott-Knott.

5.3 Influência do tempo na produção de EPS

Na condição otimizada, foram realizados ensaios para verificar o melhor tempo de produção de EPS. Os resultados mostram que à medida que se aumentou o tempo de fermentação, a produção de EPS também se elevou, atingindo uma média de 6,61 g/L em 168 h de cultivo, sendo estatisticamente diferente dos demais valores (Figura 7). Isso representa uma produtividade de 0,04 g/L/h. A máxima produção de biomassa (3,8 g/L) ocorreu em 48 h e permaneceu estatisticamente constante até o final da fermentação (168 h), indicando que a população estabilizou, como mostra a Figura 8. O pH apresentou leve acidificação ao longo do tempo, caindo de 5 para cerca de 4 no final da fermentação (Figura 9).

Figura 7: Relação entre o tempo de cultivo e os valores de EPS produzidos.

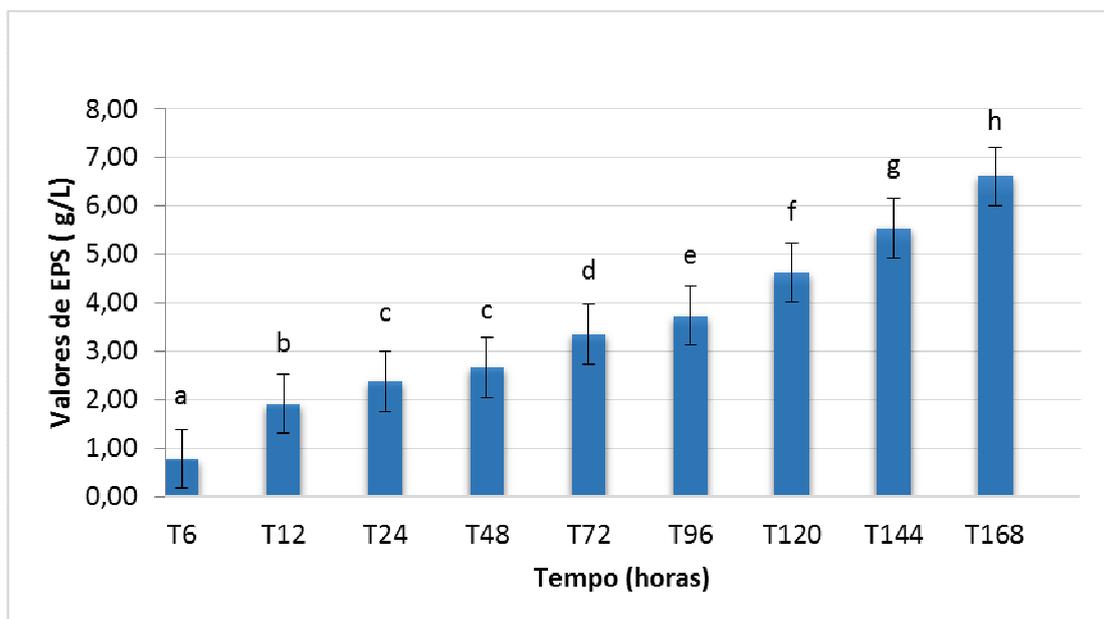


Figura 8: Relação entre o tempo de cultivo e os valores de biomassa produzida.

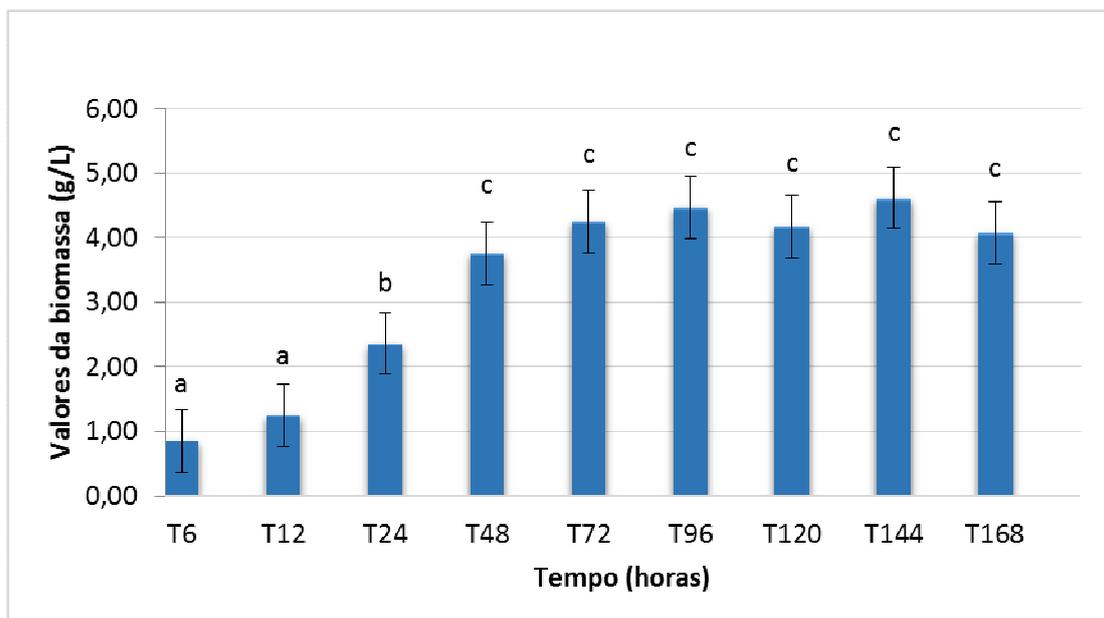
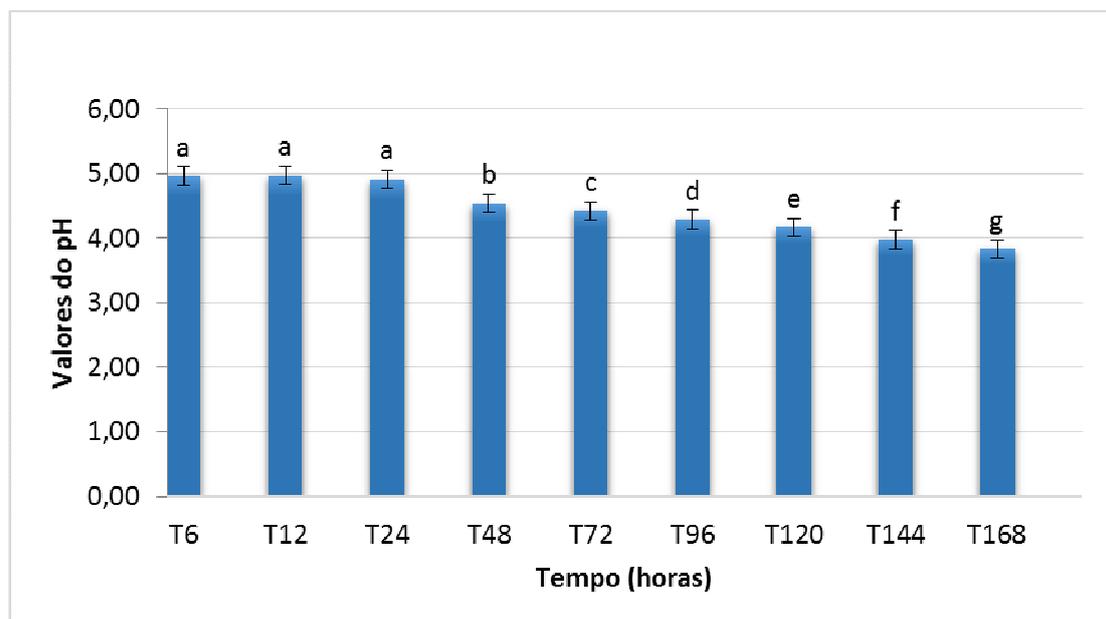


Figura 9: Relação entre a variação do pH do meio ao longo do tempo.



6.0 DISCUSSÃO

Alguns autores estudaram a produção de EPS a partir de várias fontes de carbono como glicose, sacarose, frutose, entre outras, por várias espécies de leveduras, incluindo *C. laurentii*. Os maiores rendimentos em tais trabalhos foram obtidos com sacarose, mostrando que esta é a fonte de carbono melhor assimilada e convertida em EPS pelas leveduras (PAVLOVA et al., 2009; RAVELLA et al., 2010; HEREHER et al., 2018; SILAMBARASAM et al., 2018). Isso explica a elevada produção de EPS neste trabalho, uma vez que, o melão de cana-de-açúcar contém, em média, de 30 a 40% de sacarose em sua composição (XU; XU, 2014; MIRZA; MUSHTAQ, 2006). Outros trabalhos que utilizaram melão como fonte de carbono também descreveram produções mais elevadas de EPS do que em sacarose (RUIZ et al., 2015; MOGHANNEM et al., 2018; SIRAJUNNISA et al., 2018). Além de ser rico em sacarose, o melão também apresenta aminoácidos e sais como fosfatos, sódio, cálcio, magnésio, fósforo (XU; XU, 2014; SOUKOULIS, 2018). Essa combinação de macro e microelementos provavelmente contribuiu para melhorar a produção de EPS, fazendo do melão uma boa alternativa de substrato para este fim.

Analisando os trabalhos da literatura, observa-se que, para bactérias, o pH inicial ideal ficou em torno de 6,0-6,5 e para fungos em torno de 5,0, mostrando que a faixa

ótima de pH inicial para a produção de EPS é também aquela ideal para o crescimento de cada microrganismo, pois é necessário que o microrganismo cresça inicialmente no meio para que a produção de EPS ocorra (HEREHER et al., 2018). Isto pode explicar a melhor produção de EPS pela levedura *C. laurentii* SD7 em pH inicial 5,0.

Quase não existem pesquisas utilizando a milhocina como fonte de N para a produção de EPS (SHARMA, 2013). Este substrato é muito citado em processos fermentativos na produção de etanol e ácidos orgânicos (SAXENA; TANNER, 2012; AMADO et al., 2017). Entretanto, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho a milhocina foi uma fonte de nitrogênio eficiente na produção de EPS. As concentrações utilizadas neste trabalho não foram estatisticamente significativas ao nível de 10% de significância. No entanto, a literatura mostra que as concentrações baixas de fontes de nitrogênio são decisivas para um bom rendimento na produção de EPS (SHARMA et al., 2013). Além disso, no caso da milhocina, já foi descrito que a sua utilização em grande quantidade como fonte de nitrogênio pode reduzir muito a produção de EPS devido à presença de ácido lático em sua composição, que acaba atuando como um inibidor no meio fermentativo (SHARMA et al., 2013).

Os resultados obtidos com o DCCR 2³ mostram que a produção máxima de EPS foi de 2,65 g/l em 48 horas utilizando o melaço, compatível com a maior parte dos trabalhos da literatura que descrevem uma produção de EPS que varia de 1,0 a 3,0 g/L, em média, em um período maior de fermentação e, principalmente, em meios contendo fontes simples e mais caras de carbono, sendo pouco descrito o emprego de substratos agroindustriais para este fim (FANG et al., 2002; SELBMANN et al., 2002; PAVLOVA et al., 2004; POLI et al., 2010; GIENKA et al., 2015). Isso demonstra que *C. laurentii* SD7 obteve uma elevada produção em um substrato residual de custo menor do que aqueles tradicionais, sendo atingido o objetivo de redução de custo do processo, em um período menor de tempo.

A concentração da fonte de carbono apresentou um efeito significativo na produção de EPS, pois foi observado que a medida que se aumentou a concentração de melaço maior foi a produção de EPS (Figuras 3 e 4). Esses resultados são similares aos resultados obtidos por Herenher et al. (2018) que relataram que a produção do EPS é estimulada pelo excesso da fonte de carbono e, quando este se apresenta em baixa concentração, é preferencialmente utilizado para a produção de biomassa.

Neste trabalho pode ser observado que uma produção significativa de EPS começa a ocorrer no final da fase log e ao longo da fase estacionária, o que pode ser demonstrado devido a estabilização nos valores observados de biomassa. Esses mesmos resultados foram obtidos por diversos outros autores (POLI et al., 2010; MOGHANNEM et al., 2018). Em alguns trabalhos é relatado que a produção de EPS começa a diminuir após a fase estacionária devido a ação de glicosil hidrolases que são liberadas no meio de cultivo após a morte celular (MOGHANNEM et al., 2018). No entanto, este fenômeno não foi observado com *C. laurentii* SD7, que apresentou aumento contínuo até 168 h. Isto provavelmente ocorreu porque os testes de produção de EPS não atingiram a fase pós estacionária do microrganismo estudado.

Alguns trabalhos relatam que a medida que há um aumento na produção de EPS, ocorre uma acidificação do meio de cultivo ao longo do processo, assim como foi observado neste trabalho (PAVLOVA et al., 2009; POLI et al., 2010; VIDEVA et al., 2011). Esta situação pode ser favorável, no sentido de que pHs mais ácidos evitam a contaminação bacteriana no processo fermentativo (POLI et al., 2010). Alguns autores explicam que a utilização de íons de amônio para produção de EPS, pela levedura, resulta na ejeção de prótons para o exterior da célula o que acarreta em valores de pH mais baixos do que aquele inicial, e que pode ser observado após algumas horas de fermentação (CHO et al., 2001; GIENKA et al., 2016). Entretanto, Smirnou et al. (2014) já demonstraram que na própria composição de alguns EPS pode haver ácido glicurônico, o que pode, também, vir a ser o motivo do aumento da acidificação do meio com o aumento de EPS produzido.

Gientka et al. (2016) descreveram que ao longo do processo de produção de EPS ocorreu uma forte acidificação do meio de cultivo chegando a cair do pH 5,5 para 1,8 com várias espécies de leveduras, o que não ocorreu no presente trabalho, onde a variação no pH ao longo do tempo não foi tão acentuada. Estes resultados são similares aos obtidos por Grigorova et al. (1999) que observaram que entre todas as fontes de carbono estudadas a única onde não ocorria uma mudança significativa do pH era o melão. Esta situação deve-se, provavelmente, a capacidade tamponante, de aminoácidos presentes no melão, que ajudam a manter o pH estável por um maior período (DUMBREPATIL et al., 2008).

7.0 CONCLUSÃO

A levedura *C. laurentii* SD7 apresentou grande potencial para produção de EPS, uma vez que, sua produção foi similar àquela descrita na literatura em substratos de custo mais elevado e em um maior período de tempo. O melaço de cana-de-açúcar e a milhocina se apresentaram eficientes e o direcionamento dos mesmos para processos fermentativos como a produção de EPS pode ser uma alternativa viável em termos de custo e de sustentabilidade.

8.0 REFERÊNCIAS

AMADO, I. R.; et al. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181-187, 2017.

BARBOSA, A. M.; et al. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BERNARDES, A.; et al. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, 2014.

CAPEK, P. et al. An extracellular galactoxylomannan of acapsular *Cryptococcus laurentii* mutant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 4, p. 394-396, 2008.

CHO, D. H.; et al. Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 183-193, 2001.

CUNHA, M. A. A.; et al. Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MMPI. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v 39, p 1179 – 1188, 2008.

DENNY, T. P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 173-197, 1995.

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

DUMBREPATIL, A.; et al. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 333-335, 2008.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 769-774, 2002.

FELTRIN, V. P.; et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 0-0, 2000.

FREITAS, F.; et al. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674-1683, 2017.

GIENTKA, I.; et al. Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties - review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 14, n. 4, p. 283-292, 2015.

GIENTKA, I.; et al. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 31-37, 2016.

GRIGOROVA, D.; et al. I. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 181-191, 1999.

HEREHER, F.; et al. Cultural optimization of a new exopolysaccharide producer “*Micrococcus roseus*”. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 632-639, 2018.

HUSSAIN, A.; et al. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10-27, 2017.

KUMAR, A. S.; et al. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 103-117, 2007.

LI, H.; et al. Sustainable resource opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 56-64, 2015.

LOOIJESTEIJN, P. J.; et al. Regulation of Exopolysaccharide Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the Sugar Source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5003-5008, 1999.

MIRZA, M. A.; MUSHTAQ, T. Effect of supplementing different levels of corn steep liquor on the post-weaning growth performance of pak-karakul lambs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 135-137, 2006.

MOGHANNEM, S. A.; et al. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018.

MORRIS, G.; HARDING, S. Polysaccharides, microbial. **Encyclopedia of Microbiology**, v. 3, p. 482-494, 2009.

NOUHA, K.; et al. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 66, p. 225-245, 2017.

ÖZCAN, E.; ÖNER, E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass sources. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, p. 161-184, 2015.

PANDEY, A.; et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.

PAVLOVA, K.; et al. Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 435-439, 2004.

PAVLOVA, K.; et al. Production of an exopolysaccharide by Antarctic yeast. **Folia Microbiológica**, v. 54, n. 4, p. 343, 2009.

PAVLOVA, K.; et al. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL 100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 8, p. 1038-1052, 2011.

POLI, A.; et al. Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL 1 isolated from Livingston Island, Antarctica. **Folia Microbiológica**, v. 55, n. 6, p. 576-581, 2010.

PRASANNATH, K. Pathogenicity and virulence factors of phytobacteria. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2013.

RAVELLA, S. R.; et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers** v. 82, n. 3, p. 728-732, 2010.

REBELATO, M. G.; et al. Ponderação do impacto ambiental dos resíduos e subprodutos da produção industrial sucroenergética. **Revista Gestão Industrial**, v. 9, n. 2, 2013.

RUIZ, S. P.; et al. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 15-28, 2015.

SANTOS, L.; et al. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, 2012.

SANTOS, P. S.; et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.4, n 04, 2018.

SARDARI, R. R. R.; et al. Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 1-8, 2017.

SAXENA, J.; TANNER, R. S. Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1553-1561, 2012.

SELBMANN, L.; et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 585-592, 2002.

SEVIOUR, R. J. et al. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.12, p.279-298, 1992.

SHARMA, N.; et al. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 95-101, 2013.

SILAMBARASAN, S.; et al. Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula sp.* strain CAH2 under abiotic stress conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 55-62, 2018.

SILVA, M. L. C.; et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, p. 85-92, 2006.

SIRAJUNNISA, A. et al. Effect of synthetic carbon substrates and cane molasses, an agro waste on exopolysaccharide production by *P. fluorescens*. **International Journal of Science and Engineering Applications**, v. 1, n. 1, p. 60-66, 2012.

SMIRNOU, D.; et al. *Cryptococcus laurentii* extracellular biopolymer production for application in wound management. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1344-1353, 2014.

SONG, Y.; et al. Optimal production of exopolysaccharide by *Bacillus licheniformis* KS-17 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 417-423, 2013.

SOUKOULIS, C.; TZIA, C. Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial sucrose substitutes in chocolate ice cream: A feasibility study. **International Dairy Journal**, v. 76, p. 18-29, 2018.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. In: **Advances in microbial physiology**. Academic Press, 1972. p. 143-213.

VIDEVA, S.; et al. Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL62. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. sup1, p. 80-84, 2011.

WOICIECHOWSKI, A. L.; et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Capítulo de Biotecnologia de Alimentos, Coleção Ciência, Tecnologia, Engenharia de alimentos e Nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte**, v. 12, p. 143-172, 2013.

XU, K.; XU, P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 23-29, 2014.

XU, S.; et al. Series fermentation production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 177-182, 2015.

ZHOU, K.; et al. Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 205-214, 2016.

ZIHARE, L.; et al. Multi criteria analysis for products derived from agro-industrial byproducts. **Energy Procedia**, v. 147, p. 452-457, 2018.