

Avaliação do Hidrolisado Químico de Melaço de Soja para Bioprodução de (1→6)-β-D-glucana Microbiana

Evaluation of Soybean Molasses Hydrolysate for Bio production of (1→6)-β-D-Glucan Microbial

Marcelo Luis Kuhn Marchioro
marcelomarchioro@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Mário Antônio Alves da Cunha
mcunha@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Vidiany Aparecida Queiroz Santos
vidianyqueiroz@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a utilização de meio de cultivo a base de hidrolisado de melaço de soja para a bioprodução de lasiodiplodana em cultivo submerso pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Lasiodiplodana é uma glucana extracelular do tipo (1→6)-β-D-glucana, que apresenta diferentes funcionalidades biológicas, incluindo atividades antioxidante, hipocolesterolêmica e antiproliferativa. Melaço de soja clarificado foi submetido a hidrólise química, utilizando ácido sulfúrico como catalisador. Fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de hidrolisado de melaço de soja (3,5 °Brix) com pH ajustado para 5.5 e sem suplementação nutricional. Um volume de 10 mL de suspensão micelial com concentração padronizada foi empregado como inóculo. Os ensaios foram conduzidos em shaker a 28 °C, 150 rpm por 102 h, sendo retiradas amostras a cada 24 horas. Os teores de açúcares iniciais e residuais (estaquiose, rafinose, sacarose, galactose, glicose e frutose) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a produção de lasiodiplodana e biomassa micelial foi estimada por gravimetria. A hidrólise do melaço de soja promoveu a quebra dos oligossacarídeos em açúcares assimiláveis. O hidrolisado de melaço de soja não demonstrou toxicidade aparente ao fungo, o qual foi efetivo no consumo de substrato ($Y_c \cong 71\%$), no crescimento micelial ($P_x = 6.85 \text{ g/L}$) e na produção de lasiodiplodana ($P_f = 2,6 \text{ g/L}$, 72 h). Os resultados obtidos indicam que o melaço de soja pode ser empregado como um substrato alternativo e de baixo custo, para a produção de lasiodiplodana.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrólise ácida, resíduo de soja, biomoléculas.

ABSTRACT

This work aimed to assess the use of soybean molasses hydrolysate as a substrate for lasiodiplodan bioproduction in submerged cultivation by the *Lasiodiplodia theobromae* MMPI fungus. Lasiodiplodan ((1→6)-β-D-glucan) is a exocellular glucan that present different biological functionalities, including antioxidant, hypocholesterolemic and antiproliferative activities. Clarified soybean molasses were subjected to chemical hydrolysis using sulfuric acid as a catalyst. Fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of soybean molasses hydrolyzate (3.5 °Brix) with pH adjusted to 5.5 and without nutritional supplementation. A volume of 10 mL of mycelial suspension with standard concentration was used as inoculum. The assays were carried out in orbital incubator (shaker) at 28 °C, 150 rpm for 102 h, and samples were taken every 24 hours. Initial and residual sugars contents (stachyose, raffinose, sucrose, galactose, glucose and fructose) were determined by HPLC, and the production of lasiodiplodan and mycelial biomass was estimated by gravimetry. The hydrolysis of soybean molasses promoted the breakdown of the oligaccharides into assimilable sugars. The soybean molasses hydrolysate showed no apparent toxicity to the fungus, which was effective in the substrate consumption ($Y_c \cong 71\%$), mycelial growth ($P_x = 6.85 \text{ g / L}$) and lasiodiplodan production (P_f

Recebido: 31 de agosto de 2018.

Aprovado: 04 de outubro de 2018.

Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.





= 2.6 g / L, 72h). The results indicate that soybean molasses can be used as an alternative and low cost substrate for the lasiodiplodan production

KEYWORDS: Acid hydrolysis, soy residue, biomolecules

INTRODUÇÃO

As β -Glucanas são biopolímeros constituintes da parede celular de alguns fungos, leveduras e cereais (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Comercialmente a maioria das β -glucanas têm sido extraídas da parede celular de leveduras e cereais, e algumas podem ser produzidas e secretadas para o meio por fungos filamentos cultivados em sistemas submersos (SOMENSI, 2014). Entre as β -Glucanas extracelulares destaca-se a lasiodiplodana, que é uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (VASCONCELOS et al., 2008). Estudos demonstram que a lasiodiplodana tem atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7 (CUNHA et al., 2012), atividade antioxidante (KAGIMURA et al., 2015), efeito protetor contra danos ao DNA causados pela droga antitumoral doxorrubicina (MELLO et al., 2017), efeito hipoglicemiante e atividade transaminase (TÚRMINA et al., 2012).

O fungo *L. theobromae* tem sido bastante eficiente na produção de lasiodiplodana em meios de cultivo a base de glicose, maltose e sacarose (CUNHA et al., 2012), entretanto o uso de fontes de carbono alternativas poderia reduzir o custo de produção. Neste sentido, o melão de soja, um coproduto do processo de produção de concentrado proteico de soja, tem demonstrado potencial como substrato para a produção de bioprodutos, em função da elevada concentração de açúcares (galactose, glicose, frutose, sacarose, rafinose e a estaquiase) (SIQUEIRA et al., 2008). O presente trabalho buscou avaliar a produção de lasiodiplodana pelo fungo *L. theobromae* MMPI em cultivos submersos, usando hidrolisado de melão de soja como substrato.

METODOLOGIA

CLARIFICAÇÃO E HIDRÓLISE QUÍMICA DO MELÃO

O melão de soja foi fornecido pela empresa Selecta (Araguari, MG). O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi mantido em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol por repiques sucessivos.

O melão da soja foi clarificado através de ajuste do pH (pH 3,0) com ácido sulfúrico concentrado e centrifugação (1500 x g, 30 min.) do precipitado após 24 h. Posteriormente, o pH do sobrenadante obtido foi ajustado para 5,5 com hidróxido de sódio (6 mol L⁻¹), e o precipitado removido por centrifugação.

Na etapa de hidrólise do melão de soja, 100 mL de melão clarificado e diluído (10 °Brix) foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e o pH foi ajustado para 3,0 (H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹). Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos (1,5 atm). Em seguida a solução foi resfriada e o pH foi reajustado para 5,5.

PREPARO DO INÓCULO E PRODUÇÃO BIOTÉCNOLÓGICA DE LASIODIPLODANA

O inóculo foi preparado e padronizado conforme descrito por Kagimura et al. (2015). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio a base de melão de soja hidrolisado, sem suplementação nutricional. Os teores de sólidos solúveis totais foram ajustados

para 3,5 °Brix (7,521 g/L) e o para pH 5,5. Os frascos foram inoculados com 10 mL do inóculo padronizado e incubados a 28 °C, 150 rpm por 102h. O crescimento micelial, a produção de exopolissacarídeo e o consumo de açúcares foi monitorado por meio de amostragens a cada 24 h.

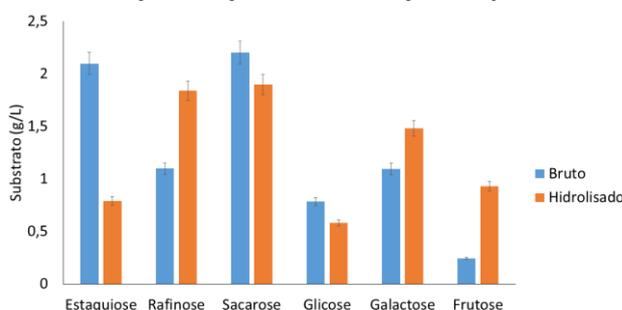
MÉTODOS ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Os teores de glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose e estaquiose foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram diluídas e passadas em filtro Sep-Pack (C18, Waters) para remoção de compostos fenólicos. Foi usada Coluna Aminex HPX87H (300 x 7.8 mm), mantida a 45 °C e detector de índice de refração. Como eluente foi usado solução de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, taxa de fluxo 0.6 ml.min⁻¹ e volume de injeção foi 20 µL. Os açúcares foram identificados por comparação de tempo de retenção com padrões autênticos. Foram determinados os parâmetros fermentativos rendimento em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) e biomassa micelial ($Y_{X/S}$), produtividades volumétricas (Q_p , Q_x), percentual de consumo de substrato (Y_c) e rendimento específico (Y_e) (CUNHA et al., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser verificado na Figura 1, após a hidrólise do melão de soja pode-se visualizar a diminuição da concentração de estaquiose (tetrassacarídeo: galac-galac-gli-fru) e sacarose (dissacarídeo: gli-fru) e um conseqüente aumento da rafinose (trissacarídeo: galac-gli-fru), galactose e frutose. O aumento nas concentrações de rafinose e galactose após hidrólise, pode ser justificado pela hidrólise parcial da estaquiose, com conseqüente liberação de uma galactose. Similarmente, a hidrólise parcial da sacarose promoveu aumento na concentração de frutose no hidrolisado em relação ao melão bruto. Por outro lado, foi verificado uma pequena redução na concentração de glicose no melão hidrolisado. Tal fenômeno possivelmente está associado possível degradação da glicose a hidroximetilfurfural durante o processo de hidrólise química (ZHOU et al., 2017). Neste sentido, o mesmo fenômeno pode ter ocorrido com a frutose e a galactose, no entanto houve aumento na concentração destas após hidrólise. Isto pode ser justificado em função da hidrólise parcial dos oligossacarídeos estaquiose e sacarose liberarem maiores concentrações de galactose para o meio.

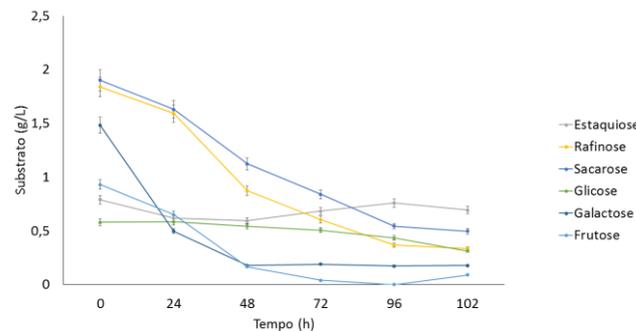
Figura 1. Concentração de açúcares no melão de soja bruto e hidrolisado.



Fonte: Autoria própria.

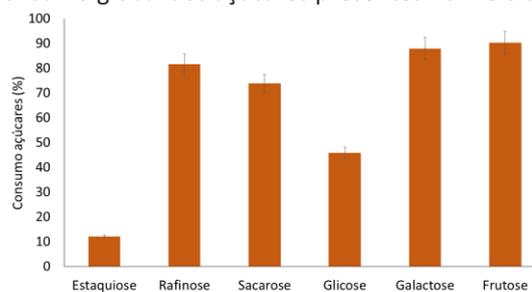
De maneira geral os açúcares presentes no meio de cultivo a base de hidrolisado de meloço de soja foram efetivamente consumidos ao longo da fermentação (Figuras 2 e 3). Consumos superiores a 80 % (Y_C) foram verificados em relação aos açúcares frutose, galactose e rafinose. Similarmente, 74 % da sacarose foi consumida após 102 h de cultivo. Por outro lado, uma menor assimilação de glicose ($Y_C = 46,0\%$) e principalmente estaquiose ($Y_C = 12,0\%$) foi verificada. A menor assimilação da estaquiose pode estar associada a possível carência na síntese da enzima α -galactosidase pelo fungo (GOES; RIBEIRO, 2002). Em relação a glicose, é importante lembrar que para a assimilação da sacarose é excretada no meio a enzima invertase, e como uma consequência há liberação de glicose. Outro aspecto possível é a presença de algum mecanismo específico de inibição de assimilação da glicose pela presença de outros açúcares no meio.

Figura 2. Concentração de açúcares ao longo da fermentação.



Fonte: autoria própria.

Figura 3. Consumo global dos açúcares presentes no meio de cultivo (102 h).



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 1, são apresentados os valores dos parâmetros fermentativos observados após 102 h de cultivo. Em relação ao substrato foi verificado um consumo total de 70,9 %, o que correspondeu a uma taxa global de consumo de 0,05 g/L.h. O fungo foi efetivo tanto em relação ao crescimento micelial (6,85 g/L) como na produção de lasiodiplodana (1,96 g/L). Em relação a produção final de lasiodiplodana, é importante destacar que maior concentração de lasiodiplodana foi verificada em 72 h (2,6 g/L). A redução de aproximadamente 25 % do conteúdo final de lasiodiplodana em 102 h comparada a 72 h, está associada a hidrólise do polissacarídeo pelo próprio fungo em função da produção de (1→6)- β -D-glucanase conforme descrito anteriormente por Cunha et al. (2012). Os rendimentos em

lasiodiplodana e biomassa micelial foram de 0,36 g/g e 1,25 g/g, respectivamente. Tais valores são superiores aos reportados ($Y_{P/S} = 0,21$ g/g e $Y_{X/S} = 0,43$ g/g) por Cunha et al. (2012) em meio contendo glicose como substrato. Estes resultados demonstram que a grande potencialidade do uso hidrolisado de melaço de soja como substrato para a produção de lasiodiplodana pelo *L. theobromae* MMPI.

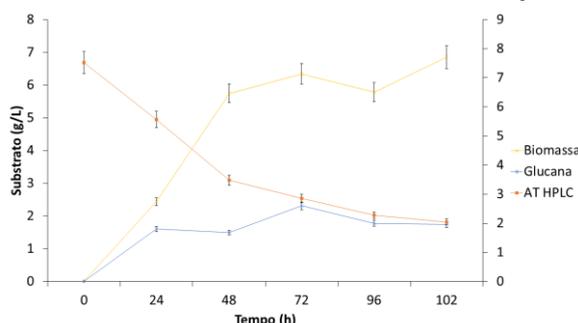
Tabela 1. Parâmetros fermentativos da produção de lasiodiplodana em meio a base de hidrolisado de melaço de soja

| Parâmetros fermentativos | Valores | | | | | |
|--------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tempo | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 102 h |
| P_X (g/L) | | 2,44 | 5,75 | 6,35 | 5,78 | 6,85 |
| P_F (g/L) | | 1,80 | 1,68 | 2,60 | 2,00 | 1,96 |
| $Y_{P/S}$ (g/g) | | 0,92 | 0,42 | 0,56 | 0,38 | 0,36 |
| $Y_{X/S}$ (g/g) | | 1,25 | 1,42 | 1,36 | 1,10 | 1,25 |
| Y_e (g/g) | | 0,74 | 0,29 | 0,41 | 0,35 | 0,29 |
| Y_c (%) | | 25,98 | 52,36 | 60,34 | 67,94 | 70,89 |
| Q_P (g/ L h) | | 0,08 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,02 |
| Q_X (g/ L h) | | 0,10 | 0,12 | 0,09 | 0,06 | 0,07 |
| Q_S (g/ L h) | | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,05 | 0,05 |

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

Na Figura 4, pode ser verificado que o consumo de substrato foi proporcional à produção de lasiodiplodana e biomassa celular.

Figura 4. Perfil fermentativo do hidrolisado de melaço de soja



Fonte: Autoria própria

CONCLUSÕES

A hidrólise química empregada no melaço de soja foi eficiente na conversão dos oligossacarídeos em açúcares assimiláveis pelo microrganismo. O hidrolisado de melaço de soja mostrou ser um meio de cultivo alternativo de baixo custo para a produção de lasiodiplodana pelo *L. theobromae*, o qual foi capaz de consumir os açúcares presentes no meio durante a fermentação, apresentando apreciáveis valores de rendimento em lasiodiplodana e biomassa micelial.



REFERÊNCIAS

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, p. 1179–1188, 2012.

GÓES, S. P. DE; LUCIA, M.; RIBEIRO, L. A-Galactosidase: General Aspects and Its Application on Soybean Oligosaccharides. **Ciências Agrárias**, v. 23, p. 111–119, 2002.

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.

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

MELLO, M.B.; MACHADO, C.S.; RIBEIRO, D.L.; AISSA, A.F.; BURIM, R.V.; ALVES DA CUNHA, M.A.; BARCELOS, G.R.M.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. **Toxicology**, v. 376, p. 66-74, 2017.

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

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de β-(1→6)-D-Glucana e Obtenção de Derivado por Carboximetilação Visando Atividade Biológica**. 2014. 101 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

TÚRMINA, J.; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SANTOS, F. S.; SILVA, S. A.; MALFATTI, C. R. M. Toxicological Assessment of β-(1→6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298–14309, 2012.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R. da; SILVA, M. L. C.



Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

ZHOU, C.; ZHAO, J.; YAGOUB, A. E. G. A.; Ma, H.; Yu, X.; Hu, J.; Bao, X.; Liu, S. Conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural in different solvents and catalysts: Reaction kinetics and mechanism. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, p. 477–487, 2017.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.