

## Bioprospecção de Fungo Filamentoso com Potencial para a Produção de Exopolissacarídeo

### Filamentous Fungus Bioprospecting with Potential for Exopolysaccharide Production

#### RESUMO

**Marcelo Luis Kuhn Marchioro**  
[marcelomarchioro@alunos.utfpr.edu.br](mailto:marcelomarchioro@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

**Mário Antônio Alves da Cunha**  
[mcunha@utfpr.edu.br](mailto:mcunha@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros secretados no meio por alguns microrganismos quando cultivados em cultivos submersos. Estas macromoléculas chamam a atenção por suas propriedades bioativas e tecnológicas. O objetivo deste trabalho foi a bioprospecção de fungos filamentosos com potencial para a produção de exopolissacarídeos, e seleção de fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, manitol e lactose) e nitrogênio (peptona, extrato de levedura, triptona, sulfato de amônio e nitrato de sódio) para o bioprocessamento. Amostras de materiais lignocelulósicos (troncos, raízes e cascas) foram coletadas no município de Pato Branco e procedido o isolamento microbiano através de repiques sucessivos em meio agar Sabouraud. Vinte e cinco cepas foram isoladas e uma apresentou potencial para a produção de EPS. O fungo isolado foi efetivo no consumo das fontes de carbono, exceto em relação à lactose ( $Y_c < 30\%$ ). Sacarose foi a melhor fonte de carbono para a produção ( $2,87 \text{ g.L}^{-1}$ ) e rendimento em EPS ( $0,109 \text{ g.g}^{-1}$ ). Em relação à fonte de nitrogênio, peptona contribuiu para maior produção de EPS ( $2,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) e elevado crescimento celular ( $11,18 \text{ g.L}^{-1}$ ). A cepa isolada demonstrou potencial para a produção de EPS e estudos de otimização poderão incrementar a eficiência do bioprocessamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioatividade. Fermentações. Macromoléculas.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

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



#### ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are polymers secreted into the medium by some microorganisms when grown in submerged culture. These macromolecules attract attention for their bioactive and technological properties. The objective of this work was bioprospecting filamentous fungi with potential for the production of EPS, and selection of carbon (glucose, sucrose, fructose, mannitol and lactose) and nitrogen (peptone, yeast extract, tryptone, ammonium sulfate and sodium nitrate) sources for the bioprocess. Samples of lignocellulosic materials (logs, roots and bark) were collected in Pato Branco, Paraná, and microbial isolation was carried out by successive subcultures on sabouraud agar. Twenty-five strains were isolated and one presented potential for EPS production. The isolated fungus was effective in the consumption of carbon sources, except for lactose ( $y_c < 30\%$ ). Sucrose was the best carbon source for production ( $2.87 \text{ g.L}^{-1}$ ) and EPS yield ( $0.109 \text{ g.g}^{-1}$ ). Regarding the nitrogen source, peptone contributed to higher EPS production ( $2.12 \text{ g.L}^{-1}$ ) and high cell growth ( $11.18 \text{ g.L}^{-1}$ ). The isolated strain showed potential for exopolysaccharide production and optimization studies could increase the efficiency of the

bioprocess.

**KEYWORDS:** Bioactivity. Fermentations. Macromolecules.

## INTRODUÇÃO

Alguns fungos, bactérias e algas, em cultivo submerso, podem secretar para o meio, macromoléculas de carboidratos as quais comumente são chamadas de exopolissacarídeos microbianos (PATIL; SHIRSATH, 2015). Os exopolissacarídeos microbianos tem ampla aplicação na indústria-de alimentos por serem capazes de formar géis e soluções viscosas, melhorando as características reológicas do produto (BORGES, 2004). Alguns destes biopolímeros de origem microbiana, como as  $\beta$ -glucanas, apresentam propriedades bioativas, como capacidade antioxidante, atividade hipocolesterolêmica e imunoestimuladora (THEIS, 2017).

Considerando a importância estratégica do isolamento de novos microrganismos produtores de bioprodutos, o objetivo do presente trabalho foi selecionar e isolar fungos filamentosos com potencial para produção de exopolissacarídeo, e selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de exopolissacarídeo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DA CEPA FÚNGICA

Diferentes amostras de material lignocelulósico, especialmente biomassas em decomposição (cascas, troncos e raízes) foram coletadas no município de Pato Branco.

O isolamento dos fungos foi realizado utilizando a técnica de inoculação da amostra em placas contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol e repiques sucessivos. Após inoculação as placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas e os fungos crescidos foram repicados para placas com meio novo. As culturas isoladas foram avaliadas morfológicamente de forma visual para a verificação da efetividade do isolamento. A cultura isolada foi mantida em placas contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol sob refrigeração a 5 °C em refrigerador comercial.

### AValiação DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO

Inicialmente, inóculo fúngico foi preparado transferindo uma alçada de micélio da placa para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio mínimo de sais de Vogel e 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Os frascos foram incubados em incubadora orbital (shaker) a 28 °C por 48 sob agitação de 150 rpm. O micélio crescido foi separado do caldo por centrifugação (1500 x g, 20 min.), triturado e resuspendido em água destilada de forma a ser obtido uma suspensão micelial cuja com concentração foi padronizada por leitura de absorbância a 400 nm (leitura entre 0,4 e 0,5). Os ensaios fermentativos para a avaliação da produção de

exopolissacarídeo foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio mínimo de sais de Vogel, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 mL de inóculo previamente padronizado, os quais foram incubados a 28 °C por 96 horas sob agitação (150 rpm). O caldo fermentado foi separado da biomassa micelial por centrifugação (1500 x g, 15 min.) e o exopolissacarídeo (EPS) foi recuperado por precipitação com etanol 95% na proporção de 3 partes de etanol para 1 de caldo e repouso por 12 horas, sob refrigeração (5 °C). O EPS e a biomassa celular foram quantificados por gravimetria após secagem em estufa com circulação de ar a 60 °C (KAGIMURA, 2015).

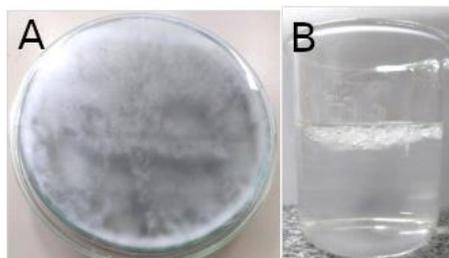
### EFEITO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO

Para a avaliação do efeito da fonte de carbono sobre a produção de EPS foram conduzidas fermentações em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio mínimo de Vogel, 20 g.L<sup>-1</sup> da fonte de carbono estudada (glicose, sacarose, frutose, manitol e lactose) e 10 mL de inóculo padronizado. Para a avaliação das fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, triptona, sulfato de amônio e nitrato de sódio, 2 g/L<sup>-1</sup>) foi utilizado meio contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, (2 g.L<sup>-1</sup>), 20 g/L da fonte de carbono pré-selecionada e 10 mL de inóculo. Todos os cultivos foram conduzidos em shaker (28 °C, 150 rpm, 96 h). EPS e a biomassa fúngica foram quantificados por técnica gravimétrica e os açúcares residuais totais quantificados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Os parâmetros fermentativos: rendimento em EPS (Y<sub>P/S</sub>), rendimento em biomassa micelial (Y<sub>X/S</sub>), rendimento específico (Y<sub>e</sub>) e consumo percentual de substrato (Y%), foram determinados conforme descrito por Cunha et. al. (2012).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 25 cepas de fungos filamentosos, sendo selecionado um fungo com potencial para a produção de exopolissacarídeo. A amostra isolada foi denominada de UTF18 e como pode ser visualizado na Figura 1A, após 96 h de cultivo houve intenso crescimento de micélio aéreo, o qual apresenta uma coloração branca acinzentada.

Figura 1 - Micélio fúngico do Isolado UTF18 (A); Exopolissacarídeo produzido pelo Isolado UTF18 (B).



Fonte: Autoria própria (2019).

Na Figura 1B pode ser verificado o exopolissacarídeo após tratamento do caldo fermentado com etanol. O EPS produzido apresentou coloração branca, o

que sugere a ausência de contaminantes pigmentados, como melanina entre outros biocompostos.

Na Tabela 1 estão descritos os resultados dos parâmetros fermentativos determinados nas fermentações conduzidas para a seleção das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de EPS.

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos para dos cultivos com o fungo Isolado UTF18 em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Fonte	P <sub>F</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	P <sub>X</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>e</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>c</sub> (%)
<b>Carbono</b>						
Glicose	2,12 <sup>b</sup>	11,18 <sup>a</sup>	0,109 <sup>b</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	97,04 <sup>a</sup>
Sacarose	2,87 <sup>a</sup>	10,96 <sup>a</sup>	0,158 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	91,22 <sup>a</sup>
Frutose	1,31 <sup>c</sup>	11,20 <sup>a</sup>	0,069 <sup>b</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,12 <sup>bc</sup>	94,33 <sup>a</sup>
Manitol	0,28 <sup>d</sup>	4,35 <sup>b</sup>	0,015 <sup>c</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,06 <sup>cd</sup>	93,51 <sup>a</sup>
Lactose	0 <sup>d</sup>	1,12 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	28,87 <sup>b</sup>
<b>Nitrogênio</b>						
Peptona	2,12 <sup>a</sup>	11,18 <sup>a</sup>	0,109 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	97,04 <sup>a</sup>
Extrato levedura	1,43 <sup>b</sup>	10,54 <sup>a</sup>	0,076 <sup>b</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,14 <sup>b</sup>	93,31 <sup>a</sup>
Triptona	1,32 <sup>b</sup>	8,43 <sup>a</sup>	0,068 <sup>b</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>b</sup>	96,92 <sup>a</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,25 <sup>b</sup>	4,15 <sup>b</sup>	0,091 <sup>ab</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,30 <sup>a</sup>	69,38 <sup>b</sup>
NaNO <sub>3</sub>	0,6 <sup>c</sup>	8,32 <sup>a</sup>	0,032 <sup>c</sup>	0,45 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>c</sup>	92,44 <sup>a</sup>

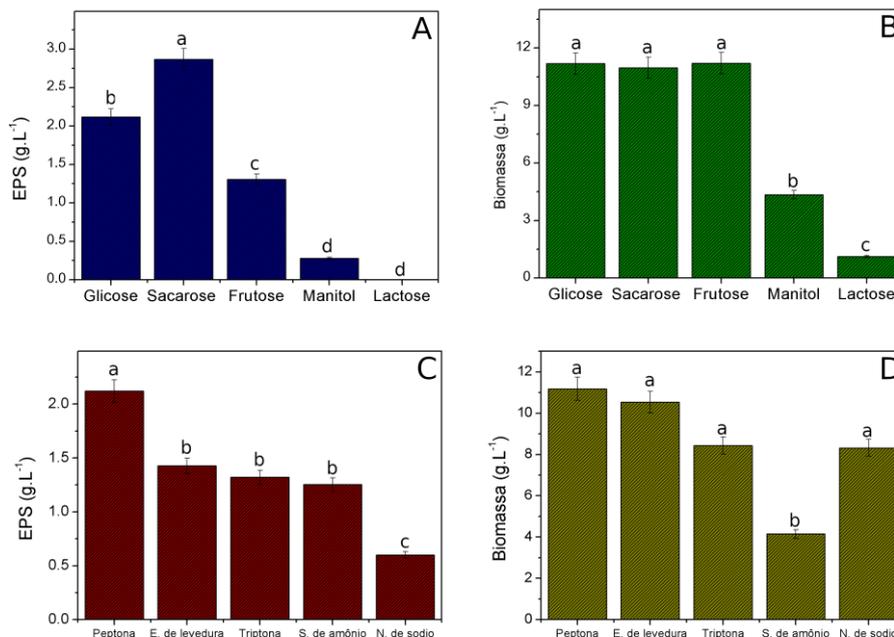
PX: produção de biomassa, PF: produção de lasiodiplodana, YP/S: conversão de substrato em lasiodiplodana, YX/S: conversão de substrato em biomassa, Ye: rendimento específico, Yc: percentual de consumo de substrato. <sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes na mesma coluna dierem estatisticamente (p<0,05).

Fonte: Autoria própria (2019).

Os melhores valores de produção de EPS (2,87 g.L<sup>-1</sup>) e rendimento em EPS (0,158 g.g<sup>-1</sup>) foram obtidos nos ensaios utilizando a sacarose como fonte de carbono. O fungo isolado foi efetivo no consumo das fontes de carbono (Y<sub>C</sub>>90%), exceto em relação a lactose (Y<sub>C</sub><30%). Além da assimilação ineficiente da lactose, nos cultivos com este açúcar não houve produção de EPS e o crescimento micelial também foi bastante reduzido (1,12 g.L<sup>-1</sup>).

Quanto a fonte de nitrogênio, os melhores valores de produção de EPS (2,12 g.L<sup>-1</sup>) e rendimento (0,109 g.g<sup>-1</sup>) em EPS foram obtidos nos meios com peptona. Extrato de levedura, triptona e sulfato de amônio não apresentaram diferença significativa entre seus valores de produção EPS (Figura 2C). Em termos de biomassa micelial, maior produção foi observada no ensaio com peptona (11,18 g.L<sup>-1</sup>), mas este valor não diferiu significativamente dos valores de extrato de levedura (10,54 g.L<sup>-1</sup>), triptona (8,43 g.L<sup>-1</sup>) e nitrato de sódio (8,32 g.L<sup>-1</sup>), conforme pode ser visto na Figura 2D. A menor produção de biomassa observada foi 4,15 g.L<sup>-1</sup>, verificada nos meios com sulfato de amônio.

Figura 2 = Produção de EPS (A) e biomassa micelial (B) em diferentes fontes de carbono; Produção de EPS (C) e biomassa micelial em diferentes fontes de nitrogênio (D).



Fonte: Autoria própria (2019).

## CONCLUSÕES

Vinte cinco (25) fungos filamentosos foram isolados de amostras de biomassa lignocelulósica, sendo identificado uma cepa potencialmente produtora de exopolissacarídeo. Sacarose e peptona demonstraram serem as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de EPS pela cepa isolada. O fungo foi efetivo na assimilação das diferentes fontes de carbono, exceto em relação à lactose, a qual consumiu menos de 30% do conteúdo inicial e não foi capaz de produzir EPS nos meios com este açúcar.

## REFERÊNCIAS

BORGES, C. D.; MOREIRA, Â. N.; MOREIRA, A. DA S.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 327–332, 2004.

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.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

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

PATIL, S. P.; SHIRSATH, L. P. Production of exopolysaccharide by an osmotolerant, thermostable and metal resistant *Bacillus subtilis*. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 2, p. 965–971, 2015.

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.

#### 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.