

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

BIOSSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA
***Cryptococcus laurentii* SD7 UTILIZANDO FONTES DE CARBONO**
E NITROGÊNIO DE BAIXO CUSTO

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO – 2021

BIOSSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurentii* SD7 UTILIZANDO FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO DE BAIXO CUSTO

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2019

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a Márcia Luciana Cazetta

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MARÇO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586b

Silva, Adriele do Amor Divino.

Biossíntese de exopolissacarídeos pela levedura *Cryptococcus laurentii* sd7 utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo / Adriele do Amor Divino Silva. _ Cruz das Almas, Bahia, 2021.
67f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola.

1.Biopolímeros – Exopolissacarídeos. 2.Biopolímeros – Testes químicos e reagentes. 3.Biomassa microbiana – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 547.25

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

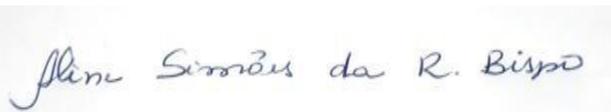
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA



Prof.^a Dr.^a Márcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientadora)



Prof.^a Dr.^a Aline Simões da Rocha Bispo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof.^o Hélio Mitoshi Kamida

Universidade Estadual de Feira de Santana

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Cristina e Agnelo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que, por muitas 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 apoio.

Aos meus padrinhos Francis e Nilton por estarem sempre presentes e contribuindo para que eu atingisse este objetivo.

Ao meu companheiro e melhor amigo Breno, por todo amor, carinho, paciência e cumplicidade. Meu amor, a tua doçura, dedicação e atenção me trazem a esperança de dias melhores.

Aos meus sogros pelo carinho, apoio e atenção.

À minha orientadora Prof.^a Dr. Márcia Luciana Cazetta, pela orientação sem igual, pelos conselhos construtivos, e por toda a confiança.

Aos meus colegas do laboratório de Bioquímica: Rafael, Jaciara, Gabriel e Gustavo por todos os momentos de descontração que tivemos no laboratório e que tornaram, de alguma forma, os dias mais agradáveis.

Aos meus amigos: Ana Luiza, Bianca, Carlos, Edileide, Jaciara, Jonatha, Jucilene, Ruane Taís pelo carinho, por todos os conselhos e por todas as vezes que me incentivaram ao longo desta jornada.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura e recursos disponíveis

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudos.

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

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do melaço de cana-de-açúcar	13
Tabela 2: Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de EPS expressas em porcentagem	32
Tabela 3: Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 para produção do EPS utilizando melaço de cana-de-açúcar, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	33
Tabela 4: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 com as variáveis codificadas e decodificadas.	34
Tabela 5: Análise de regressão da produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7 em fermentação submersa com as variáveis estudadas. $R^2 = 0,78$ e nível de confiança de 10%.....	48
Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para a produção de EPS por <i>C. laurentii</i> SD7 em fermentação submersa utilizando melaço de cana-de-açúcar, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como variáveis.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Produção de EPS (g/L), biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em diferentes fontes de carbono. letras iguais não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância ($p < 0,05$)..... 35
- Figura 2:** Produção de EPS (g/L), biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo suplementado com sacarose..... 40
- Figura 3:** Produção de EPS (g/L), biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo suplementado com melão..... 44
- Figura 4:** Superfície de resposta mostra a relação entre melão e NaNO_3 na produção de EPS por *C. laurentii* SD7..... 46
- Figura 5:** Superfície de resposta mostra a relação entre melão e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de EPS por *C. laurentii* SD7..... 47
- Figura 6:** Superfície de resposta mostra a relação entre NaNO_3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de EPS por *C. laurentii* SD7..... 47

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	3
REVISÃO DE LITERATURA	4
Polissacarídeos e Exopolissacarídeos	4
Leveduras produtoras de exopolissacarídeos	5
Principais fatores que influenciam a produção de EPS	6
- Fontes de carbono	6
- Fontes de nitrogênio	8
- Macro e Micronutrientes	8
- Temperatura, pH e aeração	10
Substratos agroindustriais para produção de EPS.....	11
Estrutura dos exopolissacarídeos produzidos por leveduras	14
Fermentação sólida e submersa para a obtenção de EPS	15
Aplicações dos EPS.....	16
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2	26
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Determinação do teor de açúcares do melão de cana-de-açúcar	29
- Açúcares redutores (Miller, 1959).....	29
- Açúcares redutores totais(Miller, 1959)	30
- Açúcares não redutores.....	30

Produção de Exopolissacarídeos (EPS) utilizando diferentes fontes de carbono	30
- Preparo do inóculo	30
- Ensaio Fermentativo	30
- Determinação da produção de EPS	31
- Determinação do crescimento celular.....	31
Produção de Exopolissacarídeos (EPS) utilizando diferentes fontes de nitrogênio	31
- Preparo do inóculo	31
- Ensaio Fermentativo	31
Otimização da produção de EPS utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional 2 ³ (Rodrigues e Lemma, 2009)	32
- Preparo do inóculo e Condições de fermentação	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
Determinação do teor de açúcares do melaço de cana-de-açúcar	34
Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de EPS e biomassa	35
Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de EPS e biomassa.....	39
Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de EPS e biomassa utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato	43
Otimização da produção de EPS	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
AGRADECIMENTOS.....	49
REFERÊNCIAS.....	49
CONCLUSÕES GERAIS	56

RESUMO

Silva, Adriele do Amor Divino. Biossíntese de exopolissacarídeos pela levedura *Cryptococcus laurentii* SD7 utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros extracelulares produzidos por microrganismos, se encontram ligados à parede celular ou são excretados no meio extracelular em forma de muco. Os EPS possuem muitas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, entre outras, devido às suas propriedades físico-químicas. No entanto, o alto custo de produção tem favorecido a busca por substratos alternativos, principalmente renováveis e de origem agroindustrial. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de substratos de baixo custo para a produção de EPS por *C. laurentii* SD7. Para isso, foi realizada a determinação do teor de açúcares totais do melão e, posteriormente, testes fermentativos para seleção de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, nas concentrações de 5 e 1% respectivamente, para a produção de EPS e biomassa microbiana. A partir dos resultados foi realizado um Delineamento Central Rotacional 2^3 (DCCR 2^3) para a determinação das melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de EPS. A melhor condição para a biossíntese do EPS foi aquela em que o meio de cultura foi suplementado com melão de cana-de-açúcar e a combinação dos sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3 . Entretanto o delineamento mostrou que o NaNO_3 não influenciou na produção de EPS a 10% de significância e, apenas o melão de cana de açúcar e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram efetivos nas concentrações de 9% e 0,2% com produção máxima de EPS de 11 g/L. Assim, concluímos que, a levedura *C. laurentii* SD7 apresentou potencial de síntese de EPS até 3,8 vezes maior do que aqueles descritos na literatura, demonstrando que esta espécie é bastante promissora e a combinação do melão de cana-de-açúcar com os sais inorgânicos foi eficiente para a produção de EPS e biomassa microbiana.

Palavras-chave: Biopolímeros, fungos, subprodutos agroindustriais

ABSTRACT

Silva, Adriele do Amor Divino. Biosynthesis of exopolysaccharides by the yeast *Cryptococcus laurentii* SD7 using low-cost carbon and nitrogen sources

Exopolysaccharides (EPS) are extracellular biopolymers produced by microorganisms, are attached to the cell wall or excreted in the extracellular medium in the form of mucus. EPS has many applications in the pharmaceutical, cosmetic, food industry, among others, due to its physicochemical properties. However, the high cost of production has favored the search for alternative substrates, mainly renewable and of agro-industrial origin. Thus, this work aimed to evaluate the use of low cost substrates for the production of EPS by *C. laurentii* SD7. For this, the determination of the total sugar content of the molasses was carried out and, subsequently, fermentative tests for the selection of different sources of carbon and nitrogen, in concentrations of 5 and 1% respectively, for the production of EPS and microbial biomass. Based on the results, a Central Rotational Design 2^3 (DCCR 2^3) was performed to determine the best concentrations of carbon and nitrogen sources for the production of EPS. The best condition for EPS biosynthesis was that in which the culture medium was supplemented with sugarcane molasses and the combination of salts $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaNO_3 . However, the design showed that NaNO_3 did not influence EPS production at 10% of significance, and only sugar cane molasses and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were effective at concentrations of 9% and 0.2% with maximum EPS production 11 g / L. Thus, we conclude that the yeast *C. laurentii* SD7 showed an EPS synthesis potential up to 3.8 times greater than those described in the literature, demonstrating that this species is very promising for future studies. In addition, the combination of sugarcane molasses with inorganic salts was efficient for the production of EPS and microbial biomass.

Key words: Biopolymers, fungi, agro-industrial by-products

INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são polímeros de açúcares produzidos por animais, plantas, algas marinhas e microrganismos (Silva et al., 2006; Özcan; Öner, 2015). Entretanto, 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 (Silva et al., 2006; 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 tempo curto (Silva et al., 2006; Özcan; Öner, 2015).

Os polissacarídeos sintetizados pelos microrganismos podem ser encontrados no citoplasma celular, e utilizados como reserva energética; na parede celular comoum 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, e percebidos pelo aumento da 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*, que 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 como excesso de nutrientes, temperaturas baixas ou pH ácido (Kumar et al., 2007; Gientka et al., 2015).

Muitas são as pesquisas que visam a produção de EPS em escala industrial, tendo em vista suas diversas aplicações nos setores alimentícios, farmacêuticos e na área médica (Pavlova et al., 2011; Gientka et al, 2015; Zhou et al, 2016; Sardari et al, 2017). No entanto, o custo-benefício desses bioprocessos

ainda se constitui um problema, pois alguns microrganismos não produzem EPS em quantidades satisfatórias e as fontes de carbono e nitrogênio tradicionais utilizadas, como glicose, sacarose, extrato de levedura, peptona, entre outras, 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, tendo em vista que, além de agregar valor aos subprodutos agroindustriais que muitas vezes são descartados, podem reduzir os problemas de contaminação ambiental (Santos et al., 2012; Ruiz et al., 2015).

Diante desse panorama, o melaço de cana-de-açúcar é uma alternativa viável pois apresenta potencial para ser utilizado nestes bioprocessos, e contém em sua composição açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos que podem substituir perfeitamente a utilização das fontes convencionais (Saxena; Tanner, 2012; Rebelato et al., 2013). Desta forma, essa pesquisa teve como objetivo a otimização da produção de exopolissacarídeos e biomassa microbiana, a partir da suplementação do meio de cultivo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Polissacarídeos e Exopolissacarídeos

Os polissacarídeos são biomoléculas de cadeias longas, compostas por mais de dez unidades de monômeros de açúcares, e que podem ser encontradas em quase todos os organismos vivos. Esses biopolímeros 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; Chaisuwan et al., 2020). Diferenciam-se entre si devido a variações nos tipos de ligações glicosídicas, no comprimento da cadeia, nas ramificações e nos tipos de monossacarídeos que os compõe, podendo ser classificados em heteropolissacarídeos, quando são compostos por unidades distintas de monômeros, ou homopolissacarídeos quando apresentam um único tipo de monômero em sua cadeia (Silva et al., 2006; Donot et al., 2012; Hussain et al., 2017).

No caso dos polissacarídeos de leveduras, a grande maioria constitui-se de heteropolissacarídeos com cadeias altamente ramificadas, apresentando os mais variados tipos de ligações glicosídicas como: α -1,2; α -1,3; α -1,4; α -1,6; β -1,3; β -1,2; β -1,6 (Gientka et al., 2015; Hamidi et al., 2020).

Os polissacarídeos podem ser obtidos a partir de algas marinhas, plantas e microrganismos, no entanto, a produção por 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 e semanas, graças ao seu ciclo de vida curto (Silva et al., 2006; Özcan; Öner, 2015; Yildiz; Karatas, 2018).

Os biopolímeros produzidos por microrganismos podem ser classificados em intracelulares, que são aqueles localizados no citosol e desempenham as mais variadas funções dentro da célula como reserva energética, por exemplo; os polissacarídeos estruturais, presentes na parede celular; e aqueles excretados

para o meio extracelular e, também denominados de exopolissacarídeos (EPS). Estes últimos podem estar ligados firmemente à superfície da célula microbiana, sendo denominados de cápsula, ou podem ser liberados no meio extracelular promovendo, muitas vezes, aumento da viscosidade (Barbosa et al., 2004; Donot et al., 2012).

Para a célula microbiana os EPS têm as funções de proteção contra fagocitose por protozoários, proteção contra estresse osmótico, dessecação, seletividade à difusão de nutrientes para o interior ou exterior da célula e, ainda, proteção contra substâncias tóxicas para as células, como os antibióticos. Além disso, os EPS constituem a matriz responsável pela formação de biofilmes microbianos (Kumar et al., 2007; Özcan; Öner, 2015).

Alguns autores classificam os EPS como metabolitos secundários, uma vez que são considerados não essenciais às funções básicas de uma célula, como o crescimento, e costumam ser produzidos em resposta a condições ambientais desfavoráveis como forma de proteção da célula (Gientka et al., 2015).

O grande interesse acerca da otimização da produção microbiana de EPS é crescente devido às suas diversas aplicações em diferentes setores industriais, pois podem ser utilizados como emulsificantes, espessantes, estabilizantes e geleificantes na indústria de alimentos e bebidas; no setor farmacêutico e de cosméticos são descritas propriedades umectantes, antitumorais, anticolesterolêmicas e anticoagulantes (Zhou et al., 2016; Sardari et al., 2017; Yildiz; Karatas, 2018; Saadat et al., 2020).

O primeiro exopolissacarídeo microbiano produzido comercialmente foi a dextrana, pela bactéria *Leuconostocmesenteroides* (Kumar et al., 2007). Atualmente, dezenas de EPS microbianos são comercializados, entre eles, gelana, cardulana, ácido hialurônico, pululanas, entre outros, com destaque para a goma xantana produzido, principalmente, pela bactéria *Xanthomonas campestris* (Kumar et al., 2007; Freitas et al., 2017).

Leveduras produtoras de exopolissacarídeos

A utilização de leveduras para a produção de EPS ainda é relativamente pequena quando comparado com os estudos que utilizam bactérias ou fungos filamentosos. Isso se deve à menor produção desses metabólitos secundários, o que limita o uso das leveduras em larga escala (Gientka et al., 2015). Entretanto,

muitos trabalhos vêm demonstrando o elevado potencial de várias leveduras para a produção de EPS com relevantes propriedades para aplicações biotecnológicas. Alguns dos gêneros mais citados são: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia*.

A levedura *Cryptococcus laurentii* é uma das espécies mais citadas como boa produtora de EPS, característica facilmente observada pela elevada viscosidade produzida por suas colônias. É uma espécie amplamente distribuída e tendo sido isolada desde ambientes de clima tropical até clima frio, como o continente Antártico (Breievorá et al., 2005; Pavlova et al., 2011; Smirnou et al., 2014; Rusinova-Videva et al., 2019).

Dentro do gênero *Rhodotorula*, a espécie *R. mucilaginosa* é uma das mais citadas como boa produtora de exopolissacarídeos biocompatíveis com boas propriedades para aplicações farmacêuticas e industriais, como atividades antioxidantes (Silambarasan et al., 2019; Hamidi et al., 2020).

Gientka et al. (2016) isolaram de kefir duas espécies de *Candida*, *C. famata* e *C. guilhermondii*, descritas como boas produtoras de EPS.

Yildiran et al. (2019) descreveram produções elevadas de EPS por leveduras isoladas de diferentes fontes ambientais, com destaque para duas linhagens de *S. cerevisiae* e *Pichiakluyveri*. Em vista disso, a bioprospecção e seleção de espécies mais eficientes, a otimização das condições de cultivo e a compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos de síntese de carboidratos são importantes para ampliar a aplicação industrial dos EPS produzidos por leveduras (Gientka et al., 2015).

Principais fatores que influenciam a produção de EPS por leveduras

- Fontes de carbono

A produção de EPS de origem microbiana está diretamente relacionada com as fontes de carbono utilizadas no processo de fermentação, que variam dependendo da espécie. Por isso, para as leveduras, muitas pesquisas realizam uma triagem de diferentes açúcares com o objetivo de determinar qual fonte de carbono é mais eficiente (Ravella et al., 2010; Gientka et al., 2016; Farinha et al., 2019). Entre os monossacarídeos mais estudados encontram-se a glicose, frutose, galactose e manose; os dissacarídeos mais utilizados são maltose, lactose e sacarose. Alguns açúcares-álcool também são frequentemente

testados, especialmente sorbitol e glicerol, entretanto, estes açúcares geralmente produzem os piores resultados em termos de produção de EPS (Gientka et al., 2016; Farinha et al., 2019).

Pavlova et al. (2011) utilizaram pentoses (xilose, arabinose e ribose) e oligossacarídeos, como rafinose, obtendo bons resultados com *C. laurentii* AL100. Dentre os dissacarídeos, a fonte de carbono que mais se destaca na produção de EPS é a sacarose, tanto em termos de frequência quanto de eficiência (Pavlova et al., 2009; Ravella et al., 2010; Rusinova-Videva, et al., 2014; Smirnou et al., 2014; Gientka et al., 2016).

Para *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula* sp. CAH2 a sacarose foi muito mais favorável do que outras fontes de carbono na produção de EPS nas mesmas condições de cultivo (Ravella et al., 2010; Silambarasan et al., 2018). Para outras espécies, outras fontes de carbono também foram favoráveis. *Candidaguilliermondii* e *C. famata* obtiveram a máxima produção de EPS tanto em meio contendo sacarose quanto maltose (Gientka et al., 2016). Para a levedura *Pseudozyma* sp., por sua vez, a produção de EPS em meio contendo sacarose como única fonte de carbono foi menor do que quando testado com glicose a 4%, alcançando produção máxima de 3,5 g/L (Sajna et al., 2013). *Rhodotorula glutinins*, *Sporidiobolus pararoseus* JD2 e *Rhodospordiumbabjevae* também apresentaram melhor produção de EPS quando cultivadas em meio com glicose como única fonte de carbono (Ghada et al., 2012; Han et al., 2016; Seveiri et al., 2020).

Além do tipo de fonte de carbono, sua concentração também influencia na produção de EPS por leveduras. O aumento da concentração da fonte de carbono é, de modo geral, diretamente proporcional à produção de EPS. A limitação ocorre devido ao aumento da viscosidade do meio, o que leva à diminuição da produtividade (Ghada et al., 2012; Han et al., 2016; Seveiri et al., 2020).

Cho et al. (2001) observaram uma elevação de cerca de 23% na produção de EPS com o aumento de 30 g/L para 100 g/L de glicose, entretanto, a produtividade reduziu pela metade. Resultados similares podem ser observados nos trabalhos de Pavlova et al. (2011) e RusinovaVideva et al. (2014) para *C. laurentii* LA100 e *C. laurentii* AL62, cuja produção de EPS se elevou com o aumento da concentração de sacarose de 30 g/L para 50g/L, mas a produtividade

se manteve constante. Inclusive, para *C. laurentii* AL100 a concentração de 50g/L foi onde ocorreu a menor produção e a fermentação foi prolongada em 24 horas.

Isso ocorre porque o aumento da concentração de açúcares eleva a produção de EPS que, por sua vez, eleva também a viscosidade do meio. O aumento da viscosidade provoca limitação na distribuição do oxigênio, além de inibir a transferência de massa entre as células e os nutrientes, o que causa a diminuição na produtividade (rendimentos por hora de fermentação) do EPS (Cho et al., 2001).

- Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio são essenciais para a produção microbiana de EPS. Contudo, vários trabalhos têm mostrado que condições limitantes de nitrogênio no meio de cultivo estimulam a produção destas biomoléculas e, em contrapartida, quando presentes em grande quantidade apresentam efeitos negativos na produtividade (Babosa et al., 2004).

A maioria dos meios de cultivo para produção de EPS conta com uma combinação de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas. Dentre as fontes de nitrogênio orgânicas, a mais descrita na literatura é o extrato de levedura, seguido da peptona, e, como fonte inorgânica, predomina o sulfato de amônio (Smirnou et al., 2014; Kharat et al., 2018; Farinha et al., 2019; Yildiran et al., 2019; Hamidi et al., 2020; Saadat et al., 2020). Entretanto, sais como NH_4Cl e NaNO_3 ou uréia também são bastante utilizados.

Nas pesquisas de Ravella et al. (2010) o acréscimo de NaNO_3 , juntamente com extrato de levedura e peptona, mais que dobrou a produção de EPS; o acréscimo de NH_4SO_4 , por sua vez, favoreceu a produção de biomassa.

De modo geral, as fontes orgânicas de nitrogênio resultam em maior produção de EPS do que as inorgânicas, como descrito para *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula sp.* CAH2 (Cho et al., 2001; Silambarasan et al., 2019). Isso ocorre porque além de nitrogênio, as fontes orgânicas apresentam uma composição rica em macro e micronutrientes, bem como vitaminas, que favorecem tanto o crescimento quanto a produção de EPS.

- Macro e Micronutrientes

Os macronutrientes e micronutrientes (ou elementos-traço) são sais inorgânicos e, embora utilizados em pequena quantidade, têm papel fundamental nos bioprocessos. Esses sais compreendem metais e não metais que são essenciais para a estrutura de enzimas, proteínas, vitaminas, e até mesmo de nucleotídeos (Barbosa et al., 2004; Pavlova et al., 2009). A diferença entre eles é que os macronutrientes são utilizados em maior quantidade e os elementos-traço em quantidades mínimas.

Os elementos mais utilizados em bioprocessos microbianos são: KH_2PO_4 , KCl , MgSO_4 , FeSO_4 , NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MnSO_4 , entre outros (Barbosa et al., 2004; Mahapatra e Banerjee, 2013). Geralmente, o sulfato e o fosfato são utilizados em maiores quantidades em relação aos outros, uma vez que o fosfato é um constituinte dos lipídeos de membrana e de nucleotídeos e o sulfato é muito requerido na composição de aminoácidos e metabolitos secundários, como é o caso dos EPS (Barbosa et al., 2004).

Alguns componentes do meio podem ser críticos para o crescimento celular e produtividade, outros podem ser tóxicos e, a maioria, está envolvida em interações complexas com as vias metabólicas celulares. Portanto, o equilíbrio entre presença/ ausência e concentração dos macro e micronutrientes é determinante no crescimento celular e produção de EPS. A substituição ou retirada de alguns elementos pode ser vantajosa, pois evita problemas como a precipitação de sais, e simplifica o processo sem comprometer a produção (Isidro et al., 2016).

Farinha et al. (2019) substituíram com vantagens o H_3PO_4 por KH_2PO_4 , uma vez que este último é uma fonte de dois elementos importantes, o fósforo e o potássio, sem afetar a produção de EPS. A retirada de H_3BO_3 , KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, COCl_2 , BO_3^- , I^- , MoO_4^{2-} e Co^{2+} também não apresentou influência significativa na produção de biomassa e EPS nos trabalhos de Isidro et al. (2016) e Farinha et al. (2019). Por outro lado, sais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} são descritos na literatura como essenciais na produção de biomassa e EPS. Esses microelementos tem um papel importante na atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos (Liu et al., 2017; Lin et al., 2018).

A biotina é outro constituinte do meio de cultura descrito por Farinha et al. (2019) como sendo importante e sua ausência causou diminuição significativa na produção de EPS por *Konagataella pastoris*. Além disso, como os EPS

microbianos são produzidos em resposta a condições ambientais desfavoráveis, sua produção pode aumentar em função de stress abiótico. Por isso, um significativo aumento na produção de EPS por *R. mucilaginosa* CAH2 foi observado com o aumento nas concentrações de Al e NaCl no meio de cultivo (Silambaradan et al., 2019).

Musa et al. (2018) descreveram que a produção de EPS é uma das respostas fisiológicas dos fungos ao estresse salino, uma vez que apresentam função protetora contra a alta concentração de sais e dessecação.

- Temperatura, pH e aeração

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, e varia de acordo com cada linhagem (Smirnou et al., 2014).

Um padrão geral que se observa para a maioria das leveduras descritas na literatura é que as melhores produções de EPS são obtidas na faixa mesófila de temperatura. Além disso, a melhor temperatura para produção de EPS normalmente não coincide com a melhor temperatura de crescimento. Smirnou et al. (2014) observaram que 25 °C foi a melhor temperatura para produção de EPS para *C. laurentii* DSMZ 70766, enquanto o maior crescimento celular ocorreu a 20 °C. Rusinova-Videva et al. (2019), por sua vez, utilizaram a temperatura de 22 °C para produção de EPS por *C. laurentii* AL65, isolada da Antártica.

A levedura *R. mucilaginosa* CUMS16 mostrou capacidade de crescimento na faixa de 4 °C a 30 °C, mas a melhor produção de EPS ocorreu a 25 °C (Hamidi et al., 2020).

Ravela et al. (2010) e Gientka et al. (2016) estudaram a produção de EPS por *Aureobasidium pullulanse* duas linhagens de *Candida*, respectivamente, a 28 °C. Farinha et al. (2020) produziram o EPS de *Komagataella pastoris* a 30 °C.

O pH é outro parâmetro que afeta a produção de EPS, pois atua diretamente na ação das enzimas. Além disso, influencia na solubilidade dos sais presentes no meio de cultivo e na morfologia da célula microbiana (Fang et al. 2002).

Para a maioria das leveduras é descrito pH na faixa ácida para melhor produção de EPS, de 3 a 6, predominando valores de pH inicial em torno de 5,0

(Kuncheva et al., 2013; Smirnou et al., 2014; Farinha et al., 2019; Rusinova-Videva et al., 2019).

Assim como para a temperatura, o melhor pH para o crescimento celular costuma não coincidir com o melhor pH para a produção de EPS, sabe-se que valores de pH mais ácidos são considerados melhores, como descrito por Smirnou et al. (2014).

A maioria dos trabalhos descrevem que, ao longo do processo fermentativo para a produção do EPS, ocorre acentuada acidificação do meio (Poli et al., 2010; Gientka et al., 2015; Gientka et al., 2016). Esse comportamento é descrito para a maioria das leveduras, ocasionando o acúmulo de EPS, e está relacionado com a fonte de nitrogênio, principalmente as inorgânicas (Gientka et al., 2015).

Esse fenômeno é positivo, pois o pH ácido favorece a produção de EPS. O acúmulo de EPS no meio de cultivo, especialmente em fermentação submersa, resulta em 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 e, desta forma, a agitação tem um papel muito importante para a homogeneização e distribuição dos gases e nutrientes no meio. Por isso, a maioria dos trabalhos descritos na literatura utilizam rotações elevadas, sendo 200 rpm a mais comum (Ravela et al., 2010; Pavlova et al., 2011; Gientka et al., 2016; Farinha et al., 2019). Pelo mesmo motivo, de um modo geral, maiores taxas de aeração também resultam em maiores produções de EPS para leveduras (Smirnou et al., 2014; Gientka et al., 2015). Além disso, o oxigênio molecular é requerido para o metabolismo energético primário, bem como para a oxidação de moléculas responsáveis pelo transporte dos polissacarídeos para o meio extracelular (Kumar et al., 2007).

Substratos agroindustriais para produção de EPS

São crescentes as pesquisas utilizando substratos de origem agroindustrial para a produção de EPS, uma vez que este é um fator que tem grande influência nos custos de produção (Hereher et al., 2018).

Os resíduos agroindustriais são considerados uma ótima fonte de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas e, por isso, 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 menor custo, podem ser uma alternativa aos substratos tradicionais (Bernardes et al., 2014).

Estes resíduos são, geralmente, líquidos como xaropes, melaços, sucos, soro de leite, águas residuais da moagem de azeitonas, entre outros, embora também possam ser utilizados resíduos sólidos como polpas e biomassa linocelulósica (Özcan e Öner, 2015).

Outra vantagem é que o direcionamento dos subprodutos para estes bioprocessos reduz a deposição desse material no meio ambiente, o que contribui muito para a diminuição de problemas de contaminação ambiental (Pandey et al., 2000).

No entanto, apesar dessas diversas vantagens, a utilização de tais resíduos tem a desvantagem de apresentar baixa padronização da sua composição. Isso ocorre devido às flutuações climáticas, composição do solo e condições de cultivo, da matéria prima, que geram variações na composição dos produtos agrícolas, a partir das quais estes resíduos são gerados (Woiciechowski et al., 2013).

A produção bacteriana de EPS utilizando subprodutos agroindustriais como fontes de carbono e nitrogênio é mais prolífica na literatura.

O melaço cana-de-açúcar e a milhocina são os mais citados, respectivamente (Ruiz et al., 2015; Amado et al., 2017; Wang et al., 2020).

Entretanto, são menos frequentes os trabalhos que descrevem o uso de substratos agroindustriais por leveduras na produção de EPS.

Milhocina foi utilizada como fonte orgânica de nitrogênio para a produção de EPS por *Sporidiobolus pararoseus* JD-2 e por *Aureobasidium pullulans* com bons resultados (Ravella et al., 2010; Han et al., 2016).

Sharma et al. (2013) estudaram a produção de EPS por *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 utilizando cinco diferentes resíduos agroindustriais: tortas de farelo de arroz, de farelo de soja, de semente de algodão, de semente de mostarda e milhocina como fontes de nitrogênio, atingindo cerca de 88 g/L de EPS.

Silva (2019) descreveu elevada produção EPS por *Cryptococcus laurentii* SD7 utilizando uma combinação de melaço de cana-de-açúcar e milhocina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Considerando que a sacarose é o principal substrato utilizado para produção microbiana de EPS, o uso do melaço para esta finalidade se justifica, uma vez que este subproduto contém em sua composição entre 30-60% de sacarose, além de outros açúcares como glicose e frutose (Xu et al., 2015; Soukoulis e Tzia, 2018; Palmonari et al., 2020). Além disso, possui vitaminas, minerais, proteínas e aminoácidos que podem substituir as fontes sintéticas convencionais e de maior custo (Rebelato et al., 2013; Saxena e Tanner, 2013; Soukoulis e Tzia, 2018).

O melaço é um líquido viscoso e escuro, e considerado o principal subproduto da indústria açucareira, sendo obtido durante o processo de cristalização do açúcar (Soukoulis; Tzia, 2018). Em média, para cada tonelada de cana processada, cerca de 40 a 60 Kg de melaço são gerados, o que torna este subproduto uma fonte de carbono abundante e renovável para uso em processos fermentativos, uma vez que apresenta em sua composição vitaminas, açúcares e fonte de nitrogênio (Tabela 1), capazes de fornecer um ambiente propício para os microrganismos sintetizarem biomoléculas de interesse industrial (Oliveira et al., 2019). Por esta razão, vários estudos descrevem a utilização do melaço em uma segunda cadeia produtiva, como substrato na produção das mais variadas biomoléculas como bioetanol, proteína microbiana, lipídeos microbianos, pigmentos e polissacarídeos (Arshad et al., 2019; Bento et al., 2020; Dias et al., 2020; Wang et al., 2020). Outra vantagem do melaço é seu efeito tamponante nos meios de cultivo, resultante dos aminoácidos presentes em sua composição, podendo ser empregado em bioprocessos que exigem a manutenção de pH do meio ao longo do tempo (Dumbrepatil et al., 2008).

Dessa forma, o uso de subprodutos agroindustriais para produção de EPS por leveduras é um campo aberto a ser explorado, justificado pelo seu custo-benefício e que pode ser uma alternativa sustentável e válida para alcançar a produção de EPS em escala industrial.

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

Composição	Concentração g (%)
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)

Estrutura dos exopolissacarídeos produzidos por leveduras

A composição monossacarídica dos EPS microbianos está estritamente relacionada com a composição e condições físico-químicas do meio. Entretanto, os resultados de Kharat et al. (2018) demonstraram que duas espécies de leveduras, denominadas PS1 e PS2, produziram polissacarídeos diferentes nas mesmas condições de cultivo em meio YEPD. A estrutura do EPS da linhagem PS1 apresentou glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose, enquanto o EPS de PS2 apresentou apenas glicose e frutose em sua composição.

Pavlova et al. (2011) e Rusinova-Videva et al. (2014) estudando diferentes linhagens de *C. laurentii* isoladas da Antártica e cultivadas em sacarose, descreveram polissacarídeos com diferentes composições: na linhagem AL100 a estrutura do EPS era formada de manose, glicose, galactose, ramnose, com predomínio de arabinose (acima de 60%), enquanto a linhagem AL62 apresentou, predominantemente, xilose (cerca de 45%), seguido de manose e glicose. O que esses dois EPS têm em comum é a elevada quantidade de pentoses em sua estrutura. Isso demonstra que a composição dos EPS microbianos também é espécie-dependente.

O ajuste da composição do meio de cultivo não reflete somente no tipo, mas também na proporção dos monossacarídeos constituintes. O ajuste fino entre a fonte de carbono (glicerol) e os sais na composição do meio de cultivo elevou em 10% o conteúdo do complexo quitina-glucana e em 34% o conteúdo de mananas na parede celular de *Komagataella pastoris* (Farinha et al., 2019).

Segundo Pavlova et al. (2011), de um modo geral, os EPS de leveduras contêm elevado conteúdo de carboidratos (acima de 70%), proteínas (entre 3 e 11%) e diferentes quantidades de cinzas. Na composição dos EPS de leveduras, embora bastante diversificada, predominam os açúcares glicose e manose.

Sajna et al. (2013) descreveram a produção de um EPS formados por glicose, galactose e manose (proporção 2,4:5,0:2,6) por *Pseudozyma sp.* NII 08165.

Poli et al. (2010) descreveram uma estrutura do tipo manana (polímero de manoses) no EPS produzido por *Sporobolomyces salmonicolor* AL1, isolado da Antártica e cultivado em sacarose.

O EPS produzido por *Rhodospiridium babjevae* em meio contendo glicose apresentou estrutura formada, principalmente, por manose e glicose, na proporção de 84:16 mol%, respectivamente (Seveiri et al., 2020).

Rhodotorula mucilaginosa sp. GUMS16, por sua vez, apresentou um polissacarídeo com maior proporção de glicose do que manose (85:15 mol%, respectivamente) (Hamidi et al. (2020). Alguns ácidos urônicos também fazem parte da estrutura de vários EPS de leveduras, como o ácido glicurônico (Smirnou et al., 2014; Gientka et al., 2015).

Além da fonte de carbono, mudanças físico-químicas no meio podem alterar a composição do EPS. Os resultados de Breievorá et al. (2005) mostraram que sob estresse salino o EPS de *C. laurentii var. laurentii* CCY 17-3-16 apresentou menor conteúdo de proteínas e fósforo.

Smirnou et al. (2014) descreveram que, para *C. laurentii*, o aumento do pH de 3 para 6 elevou o conteúdo de ácido glicurônico e diminuiu o conteúdo de galactose, xilose e glicose do EPS. A diminuição da temperatura de 25 °C para 15 °C, por sua vez, elevou o conteúdo e glicose.

Fermentação sólida e submersa para a obtenção de EPS

A produção de EPS pode ser realizada por meio de fermentação submersa ou, menos frequentemente, em estado sólido. Esse tipo de cultivo envolve a presença de um meio líquido, onde parâmetros como a agitação e oxigenação devem ser considerados para melhorar a distribuição dos nutrientes e oxigênio respectivamente, pelo microrganismo (Chaisuwan et al., 2020).

Na fermentação submersa, geralmente, alguns substratos agroindustriais líquidos como o melaço de cana-de-açúcar e soro de leite são frequentemente utilizados. Nesse processo, o cultivo dos microrganismos assim como a extração do EPS é, geralmente, mais simples em relação a fermentação em estado sólido. Esta última é caracterizada pela ausência de água em estado livre e portanto,

mais requerida para microrganismos que crescem e realizam seus processos metabólicos em baixa atividade de água, como é o exemplo de fungos filamentosos (Santos et al., 2018; Chaisuwan et al., 2020).

Para a fermentação em estado sólido, os substratos agroindustriais mais utilizados são a farinha de mandioca, cascas de frutas, casca de café, farelo de soja, farelo de trigo, entre outros. Neste tipo de fermentação parâmetros como o teor de umidade são de extrema importância (Santos et al., 2018).

Liu et al. (2019) descreveram diferenças na produção de EPS em fermentação sólida e submersa. Estes autores demonstraram que quando cultivado em meio sólido a produção de EPS em g/L por *Cordycepsmilitaris* foi 3 vezes maior do que em fermentação submersa.

Seesuriyachan (2012) demonstrou em seu trabalho que a produção de EPS em fermentação sólida também permitiu a obtenção de maiores rendimentos de EPS do que quando comparado a fermentação submersa. Entretanto o tempo de produção foi mais elevado.

Aplicações dos EPS

Os EPS microbianos apresentam algumas aplicações nos mais diversos setores da indústria. Essas aplicações são dependentes das atividades biológicas que os mesmos exercem, e estas, por sua vez, variam de acordo com a seu peso molecular, composição dos monossarídeos e estrutura conformacional (He et al., 2012; Chaisuwan et al., 2020). Além disso, a adição de grupos funcionais, que ocorre durante a biossíntese do EPS, pode influenciar em determinadas propriedades (Chaisuwan et al., 2020).

Liu et al. (2019) investigaram a atividade antioxidante do EPS produzido por *Lactobacillusplantarum*WLPL04purificado e após ser sulfatado. Ambos apresentaram atividade antioxidante, entretanto o EPS sulfatado inibiu de maneira significativa o aumento de espécies reativas de oxigênio em maior proporção do que quando comparado ao EPS purificado.

Jeong et al. (2017) descreveram o efeito antimicrobiano e bactericida de EPS produzido por *Lactobacilluskefirnofaciens* DN1 isolados de kefir.

He et al. (2012) descreveram a potencial atividade antioxidante de EPS produzido por *Phellinusignarius*. Estes mesmos autores também demonstraram a capacidade imunomoduladora do EPS em estudo.

Freitas et al. (2009) relataram a análise da atividade biológica do EPS produzido por cepas de *Pseudomonas*. Estes autores observaram que o EPS estudado apresentou capacidade flocculante de 82,6%, valor muito semelhante ao obtido com a goma xantana. Além disso, esse EPS também apresentou significativa atividade emulsificante de 38% que, nesse caso, foi análoga a atividade emulsificante da xantana (41%).

Kharat et al. (2018) descreveram a atividade antioxidante, flocculante e surfactante de EPS produzidos por uma espécie de levedura isolada e identificada como PS1.

Hamidi et al. (2020) relataram a capacidade antioxidante de EPS produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. O potencial de atividade antioxidante destes EPS se mostrou superior ao de EPS já utilizado na indústria de cosméticos, como é o caso do ácido hialurônico. Esses autores sugerem que o conteúdo de manose influencia na atividade do EPS.

Kuncheva et al. (2007) demonstraram a atividade emulsificante de manana e glicomanana produzidos por diferentes espécies de leveduras.

Maaelej et al. (2015) descreveram a capacidade de adsorção a diferentes tipos de metais por um EPS extraído da bactéria *Pseudomonas stutzeri* AS22. Estes autores relataram que o EPS produzido foi capaz de se ligar ao chumbo, principalmente, além de outros metais como ferro, cobre e cádmio. Assim, esses autores sugerem a utilização dos polissacarídeos produzidos por esta espécie como alternativa de biossorbentes, devido a suas propriedades tenso ativas.

Alguns autores também relatam a capacidade imunomoduladora e antitumoral de alguns EPS microbianos. Através da estimulação de células do sistema imunológico, assim como anticorpos e inibição da proliferação celular, os EPS tem sido amplamente alvo de pesquisas (Adebayo-Tayo et al., 2018).

De modo geral, os EPS, devido a suas propriedades, podem ser utilizados na indústria de alimentos como emulsificantes, estabilizantes e geleificantes; na indústria farmacêutica devido as suas propriedades anticolesterolêmicas e imunomoduladoras e na área médica como eficientes agentes antitumorais. Entretanto, o que se observa é que em sua grande maioria, as atividades bioativas descritas são relacionadas com fungos filamentosos ou bactérias. Todavia, os EPS produzidos por leveduras apresentam potencial para o

embasamento de pesquisas futuras, devido a sua diversidade estrutural e, conseqüentemente, funcional.

REFERÊNCIAS

ADEBAYO-TAYO, B.; ISHOLA, R.; OYEWUNMI, T. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. e00271, 2018

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

ARSHAD, M. et al., Ethanol production from molasses: Environmental and socioeconomic prospects in Pakistan: **Feasibility and Economic Analysis Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100317, 2019

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

BENTO, H. B. S.; et al. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: Assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. **Industrial Crops & Products**, v. 145, p. 112141, 2020

BERNARDES, A.; et al. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -amilase por *Rhizomucormiehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, 2014

BREIEROVÁ, E.; et al. Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by *Cryptococcus laurentii*. **Zeitschrift Für Naturforschung**, v. 60, n. 5-6, p. 444-450, 2005

CHAI SUWAN, W.; et al. Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications and bioactivities. **Food Bioscience**, v. 35, p. 100564, 2020

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

DIAS, C.; et al. Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridiumtoruloides* grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 1-14, 2020

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

FARINHA, I.; ARAÚJO, D.; FREITAS, F. Optimization of medium composition for production of chitin-glucan complex and mannose-containing polysaccharides by the yeast *Komagataella pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 303, p. 30-36, 2019

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

FREITAS, F.; et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 859-865, 2009

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674-1683, 2017

GHADA, S. I.; et al. Production and biological evaluation of exopolysaccharide from isolated *Rhodotorula glutinins*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 401-408, 2012

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

HAMIDI, M.; et al. Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosp.* GUMS16. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 268–277, 2020

HAN, M.; et al. Rheological properties of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Sporidioboluspararoseus*JD-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 603-613, 2016

HE, P.; et al. Purification, characterization and bioactivity of an extracellular polysaccharide produced from *Phellinus igniarius*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1697-1707, 2012

HEREHER, F.; et al. Cultural optimization of a new exopolysaccharide producer "*Micrococcus roseus*". **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

ISIDRO, I. A.; et al. Analysis of culture media screening data by projection to latent pathways: the case of *Pichia pastoris* X-33. **Journal of Biotechnology**, v. 217, p. 82-89, 2016

JEONG, D.; et al. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v. 78, p. 436-442, 2017

KHARAT, P. P.; et al. Isolation and characterization of exopolysaccharides from yeast isolates. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 2, p. 537-542, 2018

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

KUNCHEVA, M. et al. Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeasts. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, n. 5, p. 377-384, 2007

KUNCHEVA. M.; et al. Functional characteristics of an exopolysaccharide from Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL62. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 5, p. 4098-4102, 2013

LIN, T. Y.; et al. Microelements induce changes in characterization of sulfated polysaccharides from *Antrodia cinnamomea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 952–958, 2018

LIU, Z.; et al. Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities in vitro and in a Caco-2 cell model. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5922-5932, 2019

LIU. J.; et al. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1113-1124, 2017

MAALEJ, H.; et al. Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS 22 and examination of its metal-binding abilities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 356-367, 2015

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology Insights**, v. 6, MBI. S10957, 2013

MUSA. H.; et al. Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental Biotechnology. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 33-44, 2018

OLIVEIRA, M. R. B.; et al. Produção de etanol a partir de melão de cana. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 21, n. 1, p. 38-45, 2019

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

PALMONARI, A.; et al. Characterization of molasses chemical composition. **Journal of Fairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6244-6249, 2020

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 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

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, p. 392-415, 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

RUSINOVA-VIDEVA, S.; et al. Metabolic profiling of Antarctic yeasts by proton nuclear magnetic resonance-based spectroscopy. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 12-19, 2019

RUSINOVA-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.4, p. 80-84, 2014

SAADAT, Y. R.; et al. Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii*s probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103675, 2020

SAJNA, K. V.; et al. Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 84–89, 2013

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. 2, p. 0181-0188, 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

SEESURIYACHAN, P. Statistical modeling and optimization for exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* in submerged fermentation under high salinity stress. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 1647-1654, 2012

SEVEIRI, R. M.; et al. Characterization and prospective applications of the exopolysaccharides produced by *Rhodospiridium babjevae*. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 254-263, 2020

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

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, 2019

SILVA, A. A. D. Produção de exopolissacarídeos pela levedura *Cryptococcus laurentii* SD7 utilizando subprodutos agroindustriais. 29 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biologia). 2019

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

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

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

WANG, D.; et al. Improved gellan gum production by a newly-isolated *Sphingomonas azotifigens* GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 269-278, 2020

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, 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

YILDIRAN, H.; BAŞYIĞIT, K. G.; KARAHAN, Ç. A. G. Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and

exopolysaccharide production. **Food Science and Technology**, v.39, n.2, p. 616-653, 2019

YILDIZ, H.; KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41-46, 2018

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

CAPÍTULO 2

BIOSSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurentii* SD7 UTILIZANDO FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO DE BAIXO CUSTO

1 **BIOSSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA LEVEDURA *Cryptococcus***
2 ***laurentii* SD7 UTILIZANDO FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO DE BAIXO**
3 **CUSTO**

4 **SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-**
5 **DE-AÇÚCAR**

6 **Adrielle do Amor Divino Silva¹, Márcia Luciana Cazetta²**

7 ¹Laboratório de Bioquímica, Bloco L, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do
8 Recôncavo da Bahia – UFRB, Campos Universitário de Cruz das Almas, Rua Rui Barbosa, 710 - 44.380-000 - Centro -
9 Cruz das Almas/BA, Brasil. ²Laboratório de Bioquímica, Bloco L, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas,
10 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Campos Universitário de Cruz das Almas, Rua Rui Barbosa,
11 710 - 44.380-000 - Centro - Cruz das Almas/BA, Brasil. * Autor para correspondência: malucz@ufrb.edu.br

12
13 **ABSTRACT:** Microbial polysaccharides are of great biotechnological and commercial
14 interest and have wide application in the food, cosmetic and medicine industries due to their
15 emulsifying, thickener, flocculant, stabilizing, antioxidant and antimicrobial, anti-
16 cholesterolemic, anti-tumor, biosurfactant, anti-inflammatory and immunomodulatory
17 properties. However, the high cost of production has favored the search for alternative
18 substrates, mainly renewable and of agro-industrial origin. Thus, this work aimed to evaluate
19 the use of low cost substrates for the production of EPS by *C. laurentii* SD7. For this, the
20 determination of the total sugar content of the molasses was carried out and, subsequently,
21 fermentative tests for the selection of different sources of carbon and nitrogen, in
22 concentrations of 5 and 1% respectively, for the production of EPS and microbial biomass.
23 Based on the results, a Central Rotational Design 2³ (DCCR 2³) was performed to determine
24 the best concentrations of the best sources of carbon and nitrogen for the production of EPS.
25 The best condition for EPS biosynthesis was that in which the culture medium was
26 supplemented with sugarcane molasses and the combination of salts (NH₄)₂SO₄ and NaNO₃.
27 However, the design showed that NaNO₃ did not influence EPS production at 10% of
28 significance, and only sugar cane molasses and (NH₄)₂SO₄ were effective at concentrations of
29 9% and 0.2% with maximum EPS production 11 g/L. Thus, we can conclude that yeast has a
30 high potential for the production of EPS and the use of sugarcane molasses and the
31 combination of inorganic salts as substrates is very promising.

32 **Keywords:** Biopolymers, fungi, agro-industrial by-products

33 **INTRODUÇÃO**

34 Os exopolissacarídeos microbianos (EPS) são de grande interesse biotecnológico e
35 comercial e têm ampla aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos
36 devido às suas diversas propriedades biológicas tais como emulsificantes, espessantes,
37 floculantes, estabilizantes, antioxidantes, antimicrobianas, anticoagulantes, antitumorais,
38 antiolesterolêmicas e imunomoduladoras. Essas propriedades são fornecidas por um
39 conjunto de fatores como o peso molecular do EPS e sua estrutura química (Silva et al., 2006;
40 Özcan & Öner, 2015).

41 Estes biopolímeros apresentam algumas vantagens em relação aos polissacarídeos
42 tradicionais obtidos por plantas e algas, como o grau de pureza, potencial elevado de
43 polimerização e maior capacidade de retenção de água. Além disso, a produção por
44 microrganismos é mais vantajosa devido a facilidade de cultivo e controle dos parâmetros
45 físico-químicos que envolvem a produção de biomoléculas (Donot, Fontana, Baccou, &
46 Schorr-Galindo, 2012; Özcan & Öner, 2015). Um outro fator interessante é que, o processo de
47 extração dos EPS microbianos é, no geral, mais simples e rápido, devido o ciclo de vida curto
48 dos microrganismos.

49 Os EPS podem estar ligados a célula formando uma cápsula ou podem ser secretados
50 no meio extracelular em forma de limos, e percebidos pelo aumento da viscosidade do meio
51 fermentativo à medida que o período de fermentação é prolongado (Kumar et al., 2007). Esse
52 aumento da viscosidade ocorre devido ao aumento da concentração do EPS no meio de
53 cultivo. Entretanto, em meios mais viscosos a distribuição de oxigênio e nutrientes se torna
54 crítica, dificultando o metabolismo microbiano. Diante disso, para processos comerciais,
55 meios com características menos pseudoplásticas e mais newtonianas são mais desejados, e
56 portanto, deve-se levar em consideração o ajuste dos parâmetros físicos e químicos como
57 agitação, aeração, relação C: N, como forma de reduzir a interferência de fatores indesejáveis
58 ao processo (Kumar, Mody, Jha, & 2007).

59 Embora não sejam essenciais para a sobrevivência, os EPS fornecem aos
60 microrganismos proteção contra fagocitose, estresse osmótico, dessecação, formação de
61 biofilmes e muitos estão associados à virulência (Denny, 1995; Prasannath, 2013). Dessa
62 forma, podem ser considerados metabólitos secundários, produzidos em condições adversas
63 como excesso ou escassez de nutrientes, temperaturas baixas ou pH ácido (Kumar et al.,
64 2007; Gientka, Błażejczak, Stasiak-Róžańska, & Chlebowska-Śmigiel, 2015).

65 Muitas são as pesquisas que visam a produção de EPS em escala industrial, tendo
66 em vista suas diversas aplicações nos setores industriais, farmacêuticos e na área médica

67 (Pavlova et al., 2011; Gientka et al, 2015; Zhou et al, 2016; Sardari et al,
68 2017). No entanto, o custo-benefício desses bioprocessos ainda se constitui um
69 problema, pois alguns microrganismos não produzem EPS em quantidades
70 satisfatórias e as fontes de carbono tradicionais utilizadas, como glicose e sacarose,
71 apresentam custo elevado (Ruiz et al., 2015). Em função disso, têm surgido diversas
72 pesquisas que visam à utilização de substratos agroindustriais para a produção de
73 biomoléculas de interesse como os EPS (Santos, Kotovicz, Barana, & Almeida, 2012; Ruiz et
74 al., 2015; Santos et al., 2018). A utilização desses substratos se apresenta uma alternativa
75 sustentável, tendo em vista que, além de agregar valor aos subprodutos agroindustriais que
76 muitas vezes são descartados, podem reduzir os problemas de contaminação ambiental
77 (Santos, Kotovicz, Barana, & Almeida, 2012; Ruiz et al., 2015).

78 Diante desse panorama, o melaço de cana-de-açúcar é uma alternativa viável, pois
79 apresenta potencial para ser utilizado nestes bioprocessos, e contém em sua composição
80 açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos que podem substituir perfeitamente a utilização
81 das fontes convencionais (Saxena & Tanner, 2012; Rebelato, Madaleno, & Rodrigues, 2013).
82 Desta forma, essa pesquisa teve como objetivo otimizar a produção de exopolissacarídeos e
83 biomassa microbiana, a partir da suplementação do meio de cultivo com diferentes fontes de
84 carbono e nitrogênio de baixo custo.

85 **MATERIAL E MÉTODOS**

86 **Determinação do teor de açúcares do melaço de cana-de-açúcar**

87 Para as análises de comparação entre diferentes fontes de carbono e sua influência na
88 produção de EPS foram realizados testes preliminares para determinação do teor de açúcares
89 no melaço, tendo em vista que esta fonte de carbono, diferentemente das fontes convencionais
90 apresentadas na Tabela 1, apresenta uma composição complexa e sujeita a variações.

91 **- Açúcares redutores (Miller, 1959)**

92 A medição dos açúcares redutores se deu pelo método de Miller (1959) utilizando
93 DNS (3,5-di-nitrosalicinato). A solução elaborada para esta análise foi de 1g de melaço de
94 cana-de-açúcar diluída em 100 mL de água destilada, resultando em uma diluição de 1:100.
95 Posteriormente, 1 mL dessa amostra foi diluído em 2 mL de água destilada, resultando em
96 uma diluição final de 1:300. Uma alíquota de 0,25 mL da amostra foi adicionada a 0,25 mL
97 do reagente DNS, e aquecidas por 5 min a 60°C. Após esse procedimento, foram adicionados
98 2,5 mL de água destilada à amostra, e a leitura da absorbância feita em 540 nm. O resultado

99 foi obtido a partir da curva padrão de glicose e expresso em % de açúcares redutores. Os
100 experimentos foram realizados em triplicata.

101 - Açúcares redutores totais (Miller, 1959)

102 A solução elaborada para esta análise foi uma diluição de 1:100 de 1g de melaço de
103 cana-de-açúcar. Posteriormente, 1 mL dessa amostra foi diluído em 1 mL de ácido clorídrico
104 (HCL) 2N. Essa amostra foi aquecida para a hidrólise, nas mesmas condições já descritas e,
105 após resfriada, foi adicionado 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2M resultando em uma
106 diluição de 1:300. Em seguida, foi retirado 1 mL do diluído e foram adicionados 2 mL de
107 água destilada, resultando, por fim, em uma diluição de 1:900. Os passos subsequentes
108 ocorreram conforme descrito anteriormente.

109 - Açúcares não redutores

110 A obtenção dos açúcares não redutores foi determinada pela diferença entre os valores
111 de açúcares totais e açúcares redutores.

112 A partir da curva padrão da glicose, foi gerada a equação, cujo R^2 foi de 0,97:

$$113 \qquad \qquad \qquad Y = 0,5906x + 0,0061 \text{ (eq.1)}$$

114 Onde: Y= Concentração (g/L) e X= absorvância (540 nm)

115 **Produção de Exopolissacarídeos (EPS) utilizando diferentes fontes de carbono**

116 - Preparo do inóculo

117 A levedura *C. laurentii* SD7 foi obtida da coleção de culturas do laboratório de
118 bioquímica da UFRB. A levedura foi inoculada em meio Sabouraud Dextrose Ágar em placas
119 de Petri e incubada a $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas. Em seguida, foram retiradas duas alçadas de
120 colônias e adicionadas ao meio composto por (p/v): 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05%
121 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% NaCl, 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1% extrato de levedura e, diferentes fontes
122 de carbono a 5%, conforme apresentadas na Tabela 2. Esse inóculo foi mantido em rotação de
123 180 rpm e $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas.

124

125 - Ensaio Fermentativos

126 Para a análise de diferentes fontes de carbono, 2,5 mL do inóculo foram transferidos
127 para 22,5 mL de meio de cultivo para produção de EPS com a mesma composição descrita

128 para o preparo do inóculo. A fermentação ocorreu conforme descrito anteriormente e durante
129 96 horas.

130 - Determinação da produção de EPS

131 Após o período de fermentação, foi realizada a determinação do pH final das amostras.
132 Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm e 4 °C durante 20 minutos, para a
133 separação da biomassa e do sobrenadante. A este último foram adicionados 2 volumes de
134 etanol absoluto correspondente ao volume da amostra e, posteriormente, as mesmas foram
135 mantidas a uma temperatura de -4 °C durante 24 horas. Após este período, as amostras foram
136 centrifugadas novamente, conforme já descrito, para a precipitação do EPS. E,
137 posteriormente, foram secas em estufa a 80 °C e pesadas. A produção de EPS foi determinada
138 em g/L.

139

140 - Determinação do crescimento celular

141 Para a análise do crescimento celular, a biomassa foi ressuspensa em água destilada
142 no mesmo volume do caldo fermentativo e, posteriormente, foi realizada a leitura da
143 absorbância em 600 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em g/L utilizando a
144 equação obtida a partir da curva padrão de massa seca x absorbância realizada para a levedura
145 *C. laurentii* cujo o R^2 foi 0,99:

$$146 Y = 2,1696 x + 0,0722 \text{ (eq.2)}$$

147 Onde: Y= absorbância e X= concentração (g/L)

148 Produção de Exopolissacarídeos (EPS) utilizando diferentes fontes de nitrogênio

149 A partir dos resultados obtidos, procedeu-se a realização de experimentos para
150 determinar a melhor fonte de nitrogênio para a biossíntese de EPS e biomassa microbiana.

151 - Preparo do inóculo

152 O preparo do inóculo ocorreu conforme descrito para os testes com diferentes fontes
153 de carbono. A composição do inóculo foi de (p/v): 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
154 0,01% NaCl , 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Foram adicionadas diferentes fontes de nitrogênio, bem
155 como suas combinações, conforme descrito na Tabela 2. O meio foi suplementado com
156 melaço de cana-de-açúcar ou sacarose a 5%.

157

158 - Ensaio Fermentativos

159 Para a análise de diferentes fontes de nitrogênio, 2,5 mL do inóculo foram transferidos
 160 para 22,5 mL de meio de cultivo para produção de EPS com a mesma composição descrita
 161 para o preparo do inóculo. A fermentação e os procedimentos descritos para a obtenção do teor
 162 de EPS e biomassa ocorreram conforme descrito para os testes com diferentes fontes de
 163 carbono. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram avaliados
 164 por meio da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 5% de significância pelo software
 165 R.

166

167 **Tabela 2:** Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de EPS expressas em
 168 porcentagem

Fontes de nitrogênio (1%)	Fontes de carbono (5%)
Uréia	Melaço
Ureia + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sacarose
Uréia + Extrato de levedura	Glicose
Uréia + Peptona	Lactose
Uréia + NaNO_3	Maltose
NaNO_3	Sorbitol
$\text{NaNO}_3 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glicerol
$\text{NaNO}_3 + \text{peptona}$	
$\text{NaNO}_3 + \text{Extrato de levedura}$	
Peptona	
Peptona + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
Peptona + Extrato de levedura	
Extrato de Levedura	
Extrato de levedura + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	

169

170 **Otimização da produção de EPS utilizando o Delineamento Composto Central**
 171 **Rotacional 2³ (Rodrigues e Iemma, 2009)**

172 A otimização da produção de EPS foi realizada empregando-se a metodologia de
 173 superfície de resposta. A produção de EPS (g/L) foi a variável dependente e o melaço de
 174 cana-de-açúcar, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram as variáveis independentes. Uma matriz de

175 Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR 2^3) foi construída resultando em 17
 176 ensaios (Tabela 4) (Rodrigues e Iemma, 2009). Dois níveis foram selecionados, sendo um
 177 superior (+1) e um inferior (-1); dois pontos axiais (+1,68 e -1,68) e um ponto central (0) que
 178 consistiu em 3 repetições (Tabela 3). Esse modelo é representado por uma equação
 179 polinomial de segunda ordem:

$$180 \quad Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X^2 + b_{22}X^2 + b_{33}X^2 \text{ (eq. 3)}$$

182 onde: y é a resposta predita da produção de EPS; X_1 , X_2 e X_3 são as formas codificadas
 183 (Melaço, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 , b_2 e b_3 são coeficientes
 184 lineares; b_{12} coeficiente
 185 de interação dupla; b_{11} , b_{22} e b_{33} são coeficientes quadráticos. Os valores dos níveis estudados foram cal-
 186 culados por meio da Equação (4):

$$187 \quad X_n = (X - X_0) / (X_{+1} - X_{-1})$$

189 Onde: X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor
 190 real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior.

193 - Preparo do inóculo e Condições de fermentação

194 O inóculo e o meio para fermentação apresentaram a composição de (%): 0,1 de
 195 KH_2PO_4 ; 0,05 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de CaCl_2 e 0,01 de NaCl . O melaço de cana-de-açúcar,
 196 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3 foram adicionados ao meio de acordo com a Tabela 3. As condições
 197 para a obtenção do inóculo e fermentação são as mesmas descritas anteriormente.

198
 199 **Tabela 3:** Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 para produção do EPS utilizando
 200 melaço de cana-de-açúcar, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

	Variáveis codificadas				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X₁ - Melaço (%)	1,0	2,6	5	7,4	9,0
X₂ - NaNO₃ (%)	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8
X₃ - (NH₄)₂SO₄ (%)	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8

202 **Tabela 4:** Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 com as variáveis
 203 codificadas e decodificadas.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Melaço	NaNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
				(%)	(%)	(%)
1	-1	-1	-1	2,6	0,3	0,3
2	1	-1	-1	7,4	0,3	0,3
3	-1	1	-1	2,6	0,3	0,3
4	1	1	-1	7,4	0,3	0,3
5	-1	-1	1	2,6	0,7	0,7
6	1	-1	1	7,4	0,7	0,7
7	-1	1	1	2,6	0,7	0,7
8	1	1	1	7,4	0,7	0,7
9	-1,68	0	0	1,0	0,5	0,5
10	1,68	0	0	9,0	0,5	0,5
11	0	-1,68	0	5	0,2	0,5
12	0	1,68	0	5	0,8	0,5
13	0	0	-1,68	5	0,5	0,2
14	0	0	1,68	5	0,5	0,8
15	0	0	0	5	0,5	0,5
16	0	0	0	5	0,5	0,5
17	0	0	0	5	0,5	0,5

204

205 A fermentação e os procedimentos descritos para a obtenção do teor de EPS e
 206 biomassa ocorreram conforme descrito para os testes com diferentes fontes de carbono e
 207 nitrogênio. Os resultados obtidos, a partir do modelo experimental, foram analisados no
 208 programa Statistica versão 7.1.

209

210 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

211 **Determinação do teor de açúcares do melaço de cana-de-açúcar**

212 De acordo com alguns autores a composição química do melaço é bastante variada a
 213 depender do lote. Entretanto, o que se observa é que o melaço apresenta uma composição de
 214 açúcares totais que varia entre 50 a 70% (Li et al., 2015; Xu et al., 2015; Soukoulis & Tzia,

215 2018; Palmonari et al., 2020). Esses resultados diferem dos valores encontrados no presente
 216 estudo, onde o teor de açúcares totais foi de 30,85%.

217 De acordo com Woiciechowski, Carvalho, Spier e Habus (2013), os substratos
 218 agroindustriais como melação de cana-de-açúcar são boas fontes de carbono para serem
 219 empregados em processos fermentativos, devido ao elevado teor de açúcares em sua
 220 composição. No entanto, este teor de açúcares pode sofrer variações, qualitativas e
 221 quantitativas, resultantes de alguns fatores como o clima, as condições de cultivo da matéria
 222 prima, entre outros. Isso sugere a importância da determinação da composição do melação,
 223 levando em consideração a suscetibilidade do mesmo a estas variações.

224 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de EPS e biomassa

225 Conforme apresentado na Figura 1, entre as fontes de carbono testadas, o melação de
 226 cana-de-açúcar foi o melhor substrato para a produção de EPS, em média 2,5 vezes maior que
 227 a sacarose, glicose, lactose e maltose. Não houve diferenças estatísticas na produção de EPS
 228 quando o meio foi suplementado com sacarose, maltose, lactose ou glicose. O glicerol por
 229 sua vez foi o pior substrato para a produção de EPS.

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

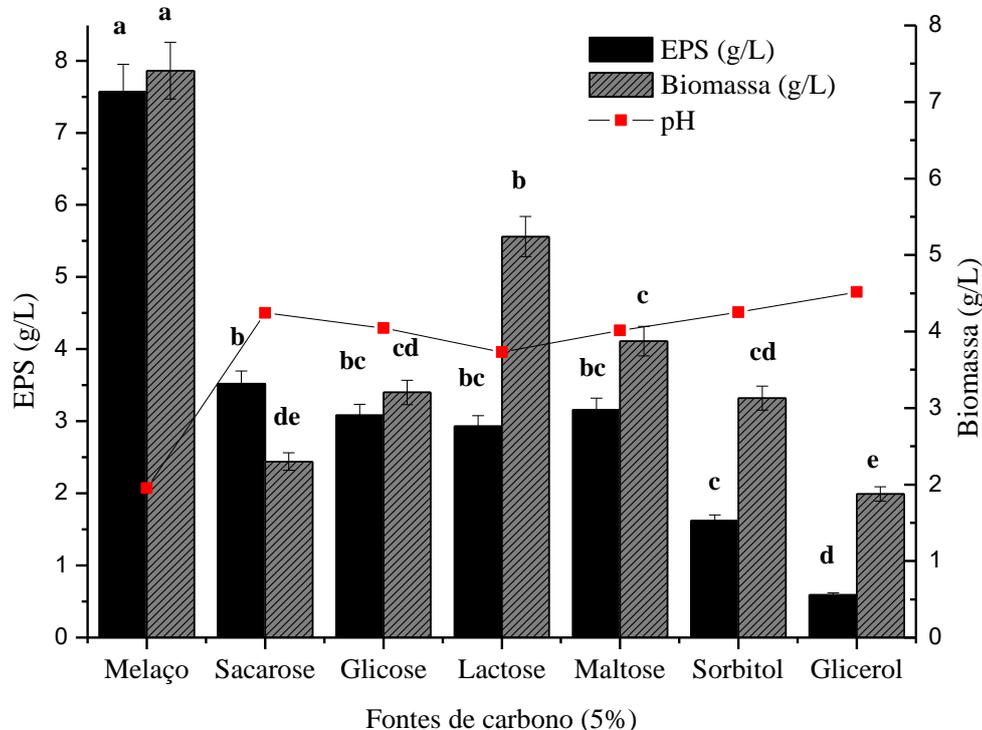
240

241

242

243

244



245 **Figura 1:** Produção de EPS (g/L), Biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em
 246 diferentes fontes de carbono. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

247 Os trabalhos com produção de EPS por leveduras utilizando melaço de cana-de-açúcar
248 são escassos. Entretanto, alguns trabalhos direcionaram os estudos para a comparação de
249 produção de EPS por bactérias, utilizando o melaço e diferentes fontes simples como glicose,
250 sacarose, maltose e lactose. O que se observa é que, de um modo geral, o melaço influencia
251 positivamente na produção, de modo a promover rendimentos de EPS bastante elevados e
252 muito melhores do que quando o meio é suplementado com fontes tradicionais como sacarose
253 e glicose, lactose e maltose (Srikanth et al., 2014; Ruiz et al., 2015; Ergene & Avci, 2017;
254 Moghannem, Farag, Shehab, & Azab, 2018; Sirajunnisa, Vijayagopal, & Viruthagiri, 2018).

255 Esses resultados sugerem que, provavelmente, os elevados rendimentos de EPS se
256 devam ao fato de que, além de ser rico em açúcares fermentescíveis, o melaço também
257 apresenta sais como fosfatos, sódio, cálcio, magnésio e fósforo, além de diversos
258 aminoácidos. Essa combinação de macro e microelementos provavelmente contribui para
259 melhorar a produção de EPS, fazendo do melaço uma boa alternativa de substrato para este
260 fim (Xu & Xu, 2014; Soukoulis & Tzia, 2018).

261 Entretanto, esses resultados variam a depender das espécies de leveduras. Gientka,
262 Bzducha-Wróbel, Stasiak-Róžańska, Bednarska, e Błażejczak (2016) relataram que a maltose
263 foi a melhor fonte de carbono para a produção de EPS por cepas de *Candida famata* e *C.*
264 *guilliermondii*, com rendimentos de 2,10 e 3,0 g/L respectivamente, em 96 horas de cultivo. A
265 produção de EPS por *C. guilliermondii* utilizando maltose representou o dobro dos
266 rendimentos obtidos quando a sacarose foi utilizada (2,10 g/L). Além disso, demonstraram
267 que a lactose não foi assimilada por *C. guilliermondii* produção de EPS e se apresentou
268 ineficiente para *C. famata*, com rendimentos de apenas de 1,0 g/L, em 96 horas de cultivo.

269 Pavlova, Koleva, Kratchnova e Panchev (2004), entretanto, demonstraram que a
270 sacarose foi a melhor fonte de carbono na produção de EPS por cepas de *Sporobolomyces*
271 *salmonicolor*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii* e *Cryptococcus* sp. com rendimentos de até
272 5,18 g/L em 168 horas de cultivo. Essa produção, quando comparada com o presente estudo
273 apresentou, estatisticamente, rendimentos muito menores, considerando que a máxima
274 produção de EPS ocorreu em um período de tempo muito maior, demonstrando que a *C.*
275 *laurentii* SD7 apresenta um elevado potencial de produção, em relação a outras espécies
276 descritas na literatura.

277 Pavlova, Panchev, Krachanova e Gocheva (2009) testaram a produção de EPS por 3
278 isolados (AL49 – AL51, AL54), três cepas do gênero *Cryptococcus* (*C. laurentii* AL7, *C.*
279 *laurentii* AL9 e *C. Flavus* AL10), *Rhodotorula minuta* AL1 e *Debaryomyces hanseni* AL3.

280 Para todos os microrganismos estudados, a produção de EPS foi maior quando o meio foi
281 suplementado com sacarose, com rendimentos de, no máximo, 3,04 g/L após 120 horas.
282 Entretanto, a produção utilizando glicose também foi eficiente e não apresentou valores muito
283 discrepantes dos primeiros.

284 Silambarasan, Logeswari, Cornejo e Kannan (2018) e Hamidi et al. (2020) observaram
285 que a produção de EPS por *Rhodotorula* sp. CAH2 e por *Rhodotorula mucilaginosa* sp.
286 GUMS16 respectivamente, foi maior quando o meio foi suplementado com sacarose. Outros
287 autores, estudando a produção de EPS por bactérias, observaram que a sacarose também se
288 destaca entre as fontes de carbono estudadas (Khani, Bahrami, Chegeni, Ghafari, & Zadeh,
289 2016; Abd-alla, Bashandy, Nafady, & Hassan, 2018). Wu et al. (2014) e Xu et al. (2017)
290 observaram que a sacarose foi a melhor fonte de carbono na produção de EPS por
291 *Paecilomyces hepiali* HN1 e por *Phellinus vaninii* Ljup, respectivamente.

292 No geral, os maiores rendimentos de EPS não parecem estar associados apenas com a
293 fonte de carbono utilizada, como dissacarídeos ou monossacarídeos, mas também com a
294 espécie do microrganismo estudado, levando em consideração o aparato enzimático
295 (Samadlouie, Jahanbin, & Jalali, 2020).

296 Samadlouie et al. (2020), por exemplo, observaram que a melhor fonte de carbono
297 para a produção de EPS por *Rhodotorula minuta* ATCC 10658, foi o amido seguido do
298 sorbitol. Esses resultados diferem do presente trabalho, onde o sorbitol, um açúcar álcool, foi,
299 entre as fontes simples de carbono, o que apresentou menores rendimentos de EPS.

300 Gientka et al. (2016) também descreveram uma baixa produção de EPS quando o meio
301 foi suplementado com o sorbitol e glicerol, com rendimentos de 0,99 g/L e 1,31 g/L
302 respectivamente, concluindo que estes substratos são, na maioria das vezes, desfavoráveis
303 porque os microrganismos não possuem enzimas adequadas para metaboliza-los.

304 Esses resultados demonstram a capacidade de *C. laurentii* assimilar diferentes
305 substratos e, portanto, é uma espécie promissora para estudos futuros.

306 Com relação aos valores de biomassa microbiana, o melaço foi a fonte de carbono que
307 mais se mostrou eficiente com rendimentos de 7,86 g/L. Estes resultados estão de acordo com
308 os de Srikanth et al. (2014) que, estudando a produção de EPS e biomassa por *Aureobasidium*
309 *pullulans* MTCC 2195, observaram que o melaço forneceu energia suficiente para bons
310 rendimentos de biomassa e de EPS.

311 Alguns trabalhos apontam que, para que ocorra o crescimento microbiano, existem
312 alguns aminoácidos essenciais que os microrganismos não conseguem sintetizar. Com a

313 suplementação de melação, essa demanda pode ter sido suprida, levando em consideração que
314 o mesmo apresenta diversos aminoácidos em sua composição (Xu & Xu, 2014; Soukoulis &
315 Tzia, 2018).

316 Gientka et al. (2016) testaram a produção de biomassa por leveduras utilizando
317 diferentes fontes de carbono. Os autores observaram que *C. famata* apresentou maiores
318 rendimentos de biomassa quando o meio foi suplementado com sorbitol e maltose atingindo
319 valores de 6,60 e 6,54 g/L, respectivamente, em 96 horas de cultivo. Nos meios
320 suplementados com sacarose, lactose e glicerol, entretanto, essa produção foi de 4,1, 4,61 e
321 5,43 g/L respectivamente.

322 Já para a *C. guilliermondii*s melhores fontes de carbono foram maltose e sacarose
323 com produção de 7,15 e 7,00 g/L, respectivamente. O glicerol e o sorbitol também foram
324 responsáveis por bons rendimentos. Entretanto a lactose não resultou em rendimentos de
325 biomassa ou de EPS.

326 Malick, Khodaei, Benkerroum, e Karboune (2017), demonstraram a produção de
327 biomassa e EPS por diferentes cepas de *Bacillus*. Estes autores observaram que, com a
328 utilização de glicose, a máxima produção de biomassa microbiana foi equivalente a 3,86 g/L
329 em 96 horas, enquanto a produção de EPS foi de 2,33 g/L, nesse mesmo período.

330 Alguns trabalhos como os de Malick et al. (2017) e Sardari et al. (2017), demonstram
331 que o crescimento celular não é diretamente proporcional a produção de EPS, pois esta
332 normalmente ocorre quando o microrganismo se encontra em condições desfavoráveis ao seu
333 crescimento. Assim, geralmente, ao final da fermentação, o que se observa é uma redução do
334 crescimento em detrimento da síntese de EPS pelo microrganismo (Ergene & Avci, 2017).

335 Esses dados não estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, onde a produção
336 de biomassa, na presença do melação de cana-de-açúcar foi proporcional a produção de EPS.
337 Esses resultados sugerem que o meio de cultivo apresentou nutrientes suficientes para
338 fornecer energia e promover o crescimento celular, porém alguns componentes do meio,
339 como por exemplo, o próprio excesso de nutrientes e o pH ácido observado, podem ter
340 favorecido a produção de EPS como mecanismo de proteção (Ergene & Avci, 2017; Han, Xu,
341 Liu, Qian, & Zhang 2018).

342 Uma característica muito marcante da produção de EPS é a variação do pH ao longo
343 do tempo (Wu, Liang, Lu, & Wu 2008; Poli et al., 2010; Rao, Sudharsan, Kasirajan, Sekaranm,
344 e Mandal, 2013). De acordo com os valores de pH ao final da fermentação, é possível notar
345 que houve uma leve acidificação do meio de cultivo quando o mesmo foi suplementado com

346 fontes simples de carbono. Entretanto, quando utilizado o melaço de cana-de-açúcar houve
347 uma variação muito elevada, alcançando valores de 2,07.

348 Pavlova et al. (2004) testaram diferentes fontes convencionais de carbono e os valores
349 iniciais de pH foram fixados em 5,3. Ao final da fermentação os autores observaram que
350 houve uma redução do pH chegando a valores de 1,8.

351 Pavlova et al. (2011) estudando a produção de EPS por *C. lautentii* AL100 observaram
352 a mudança de pH do meio de cultivo de 5,3 para 2,2, quando o meio foi suplementado com
353 sacarose.

354 Poli et al. (2010) testaram a produção de EPS por 38 espécies de leveduras antárticas e
355 observaram para todos valores de pH chegando a 1,83 ao final da fermentação.

356 Gientka et al. (2016) fixando valores iniciais de pH de 5,6, observaram ao final da
357 fermentação valores de pH que chegaram a 1,92. Entretanto, esses autores também
358 observaram que a acidificação do meio variou de acordo com a fonte de carbono utilizada.

359 No presente trabalho, entretanto, a maior variação de pH ocorreu com a suplementação
360 de melaço, onde, coincidentemente, ocorreu a maior produção de EPS. Esses resultados
361 sugerem que, provavelmente, o metabolismo de produção do EPS parece ser favorecido por
362 valores baixos de pH e este, por sua vez, parece se tornar mais ácido à medida que ocorre o
363 aumento da produção de EPS (Poli et al., 2010; Ergene & Avci, 2017).

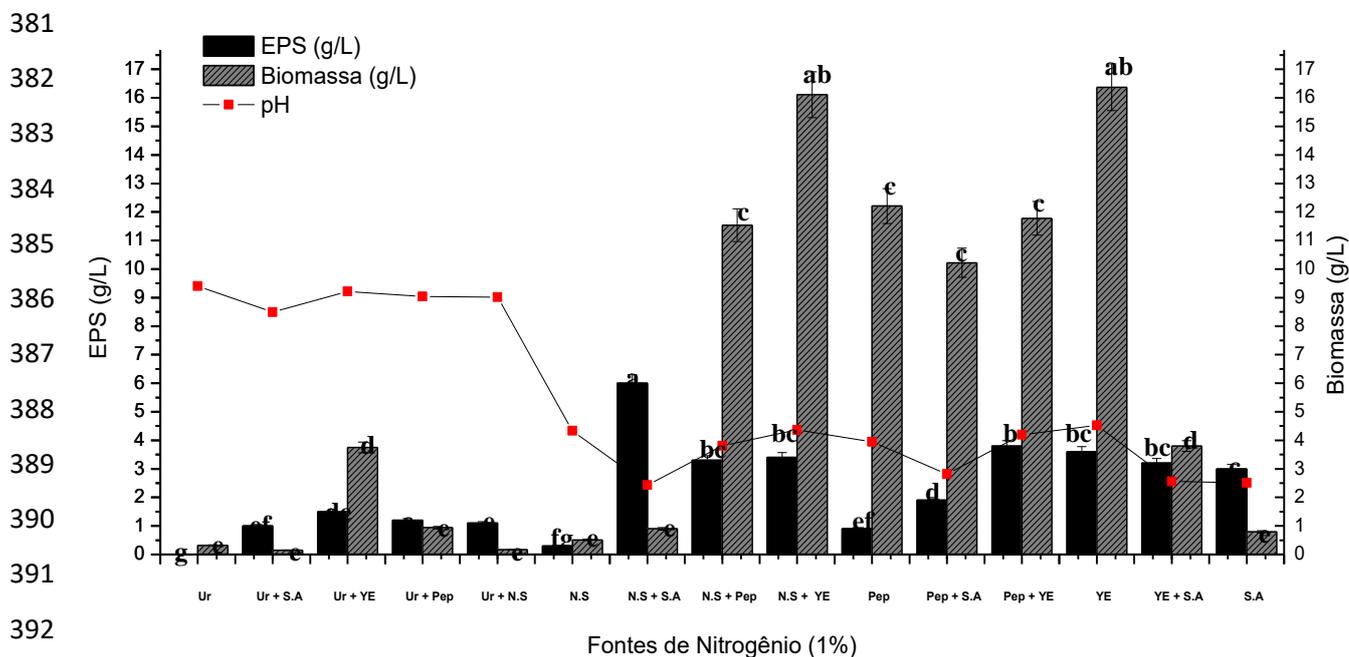
364 Alguns autores descrevem a liberação de ácidos orgânicos durante a biossíntese de
365 EPS, fator que pode ser responsável pela redução nos valores de pH. Além disso, Cho, Chae,
366 e Kim (2001), sugeriram em seu trabalho que o consumo de sais de amônio pela levedura,
367 resulta na ejeção de prótons causando a acidificação do meio. Esses resultados se assemelham
368 ao presente trabalho onde houve a suplementação de sais de amônio, $(\text{NH}_2)_4 \text{SO}_4$, no meio de
369 cultivo. Além disso, o melaço apresenta aminoácidos e proteínas que podem ter aumentado a
370 demanda de nitrogênio disponível e conseqüentemente o consumo, pela levedura, se elevou
371 provocando acentuação deste fenômeno (Xu & Xu, 2014; Soukoulis & Tzia, 2018).

372 Outra hipótese, é que alguns EPS apresentam ácidos em sua estrutura química, como o
373 ácido glicurônico, que podem ser os responsáveis pela diminuição do pH do meio quando este
374 biopolímero é produzido em grandes quantidades (Pavlova et al., 2011; Xu et al., 2017). Isso
375 pode explicar a elevada acidificação do meio de cultivo suplementado com melaço.

376

377 **Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de EPS e biomassa**

378 De acordo com a Figura 2, as fontes de nitrogênio que foram mais eficientes na
 379 produção de EPS foram o nitrato de sódio + sulfato de amônio quando o meio foi
 380 suplementado com sacarose.



393 **Figura 2:** Produção de EPS (g/L), Biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em
 394 diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo suplementado com sacarose.

395 Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukeya 5% de significância ($p < 0,05$). Ur: (Uréia); S.A:(Sulfato de amônio); Ye: (Extrato de
 396 levedura); Pep: (Peptona); NS: (Nitrato de sódio).

397 É possível observar que, quando o nitrato de sódio foi combinado com sulfato de
 398 amônio, o meio de cultivo apresentou valores baixos de pH ao final da fermentação.
 399 Coincidentemente foi onde ocorreu uma maior produção de EPS, com rendimentos de 5,95
 400 g/L. Entretanto o polissacarídeo obtido, não apresentou estabilidade após secagem e os
 401 experimentos, nesta combinação, não apresentaram repetibilidade.

402 Wu et al. (2008) também relataram a variação da composição do EPS de acordo com a
 403 fonte de nitrogênio testada. Essas pesquisas sugerem que, a depender da fonte de nitrogênio, a
 404 composição do EPS pode variar influenciando, inclusive, a sua estabilidade final e
 405 funcionalidade (Goyzueta et al., 2020).

406 Existem relatos na literatura que descrevem as fontes inorgânicas de nitrogênio como
 407 promissoras para a produção de EPS, especialmente sulfato de amônio e nitrato de sódio.
 408 Além disso, é necessário considerar que esses sais apresentam custo muito menor do que as
 409 fontes orgânicas de nitrogênio, como extrato de levedura e peptona (Wu et al., 2008;
 410 Goyzueta et al., 2020)

411 Ravella et al. (2010) demonstraram rendimentos de EPS, por uma cepa de fungo
412 semelhante a *Aureobasidium pullulans*, de 5,47 g/L, quando o meio foi suplementado com
413 NaNO_3 . O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também se mostrou uma fonte inorgânica promissora com rendimentos
414 de 3,60 g/L. Por outro lado, Silambarasam et al. (2018) demonstraram que esses sais não
415 favoreceram a produção de EPS por *Rhodotorulasp. CAH2*. Esses autores relataram a
416 produção de 2,26 e 1,69 g/L quando o meio foi suplementado com NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
417 respectivamente.

418 Khani et al. (2016) testaram diferentes fontes de nitrogênio para a produção de EPS
419 por *Chryseobacterium indologenes*MUT.2. O ácido glutâmico se destacou com uma
420 produção de 8,87 g/L, entretanto, os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3 também apresentaram elevadas
421 produções (5,32 e 4,35 g/L, respectivamente), provando que estas fontes inorgânicas são
422 promissoras.

423 Abda-Alla et al. (2018) relataram a maior produção de EPS por *Stenotrophomonas*
424 *maltophilia* (KY515467.1) e *Brevibacillus parabrevis* (KY515468.1) quando o meio foi
425 suplementado com KNO_3 . Esses autores relatam que o EPS produzido nessa condição
426 apresentou grandes quantidades de ácidos glicurônico, fato que não ocorreu quando o meio
427 foi suplementado com outra fonte de nitrogênio.

428 Wu et al. (2008) demonstraram em seus estudos que o NaNO_3 e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram
429 ineficientes na produção de EPS por *Paecilomyceshepiali* HN1 com rendimentos de 0,12 e
430 0,11 g/L respectivamente, quando testados separadamente. Esses resultados são similares ao
431 presente trabalho onde apenas o NaNO_3 não foi eficiente na biossíntese de EPS.

432 Um aspecto interessante observado no trabalho de Wu et al. (2008), é que essa baixa
433 produção se deu quando o meio foi suplementado com frutose. Entretanto, em outras
434 pesquisas, quando o NaNO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi combinado com outras fontes de carbono, os
435 rendimentos de EPS se elevaram (Ravella et al., 2010; Khani et al., 2016; Silambarasam et al.,
436 2018).

437 Dessa forma, podemos concluir que, os bons rendimentos de EPS, assim como sua
438 estabilidade e funcionalidade, não dependem unicamente da fonte de nitrogênio, mas, também
439 da fonte de carbono ao qual está sendo combinado e da cepa microbiana estudada.

440 Quando comparamos a produção de EPS nas demais combinações: nitrato de sódio +
441 peptona; nitrato de sódio + extrato de levedura; peptona + extrato de levedura e extrato de
442 levedura + sulfato de amônio, a produção de EPS é estatisticamente igual ao meio
443 suplementado com apenas o extrato de levedura. Sendo assim, o extrato de levedura se
444 mostrou a alternativa mais viável, levando em consideração o custo-benefício e a estabilidade

445 do EPS sintetizado (Seesuriyachan, Kuntiya, Hanmoungjai, & Techapun, 2011). A peptona,
446 por sua vez, mostrou-se uma fonte ineficiente para a produção de EPS.

447 Além disso, no presente trabalho é possível observar que, com a suplementação de
448 extrato de levedura, ocorreram os maiores rendimentos de biomassa e o pH do meio de
449 cultivo se manteve ácido ao longo da fermentação, o que favorece a produção de EPS e
450 diminui o risco de contaminação (Poli et al., 2010).

451 Han et al. (2018) estudaram a produção de EPS utilizando diferentes fontes de
452 nitrogênio, incluindo fontes inorgânicas. A levedura *Sporidioboluspararoseus* atingiu uma
453 produção de 7,0 g/L de EPS quando o meio foi suplementado com extrato de levedura (2%).

454 De acordo com a literatura, o extrato de levedura influencia diretamente na produção
455 de EPS pois além de fonte de nitrogênio, fornece sais de Mn^{2+} e Mg^{2+} que auxiliam no
456 crescimento celular e influenciam indiretamente na produção de EPS. Além disso, o Mg^{2+}
457 pode atuar como cofator das enzimas que participam da rota de biossíntese do EPS como já é
458 relatado para a enzima fosfoglicomutase (Seesuriyachan, Kuntiya, Hanmoungjai, &
459 Techapun, 2011).

460 Os ensaios contendo uréia na composição apresentaram os piores resultados de
461 produção de EPS, além de proporcionar o aumento do pH do meio que, no final da
462 fermentação, apresentaram valores de pH extremamente alcalinos. Isso pode ter influenciado
463 negativamente na produção de EPS e de biomassa, levando em consideração os baixos
464 rendimentos obtidos. Além disso, algumas pesquisas já demonstram que o melhor pH para o
465 crescimento e produção de EPS por leveduras fica em torno de 5,0(Poli et al., 2010).

466 Na presença de uréia, a produção de EPS e de biomassa aumentaram quando
467 combinada com o extrato de levedura. Esses dados demonstram a importância de uma fonte
468 orgânica de nitrogênio para permitir o crescimento celular (Wu et al., 2008; Schnierda, Bauer,
469 Divol, Van Rensburg, &Görgens, 2014).

470 Ravella et al (2010) testaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio na
471 produção de EPS e a uréia também se mostrou a pior fonte de nitrogênio, inclusive pior que o
472 controle (sem adição de nitrogênio), não sendo bem assimilada pelo microrganismo e inibindo
473 a produção de EPS.

474 Alguns autores, entretanto, já relataram a elevada produção de EPS e biomassa em
475 meio contendo uréia como fonte de nitrogênio para *Bacillus* sp., *Mortierella alpina* e

476 *Pestalotipsis* sp. BC55. Entretanto esses testes com leveduras são escassos (Mahapatra &
477 Banerjee, 2016; Almansoori, Al – Baldawi & Hazaimh, 2020; Goyzueta M, et al., 2020).

478 Com relação a produção de biomassa, os meios suplementados com fontes
479 inorgânicas como nitrato de sódio, sulfato de amônio ou com a combinação destas, não se
480 mostraram eficientes. Em contrapartida, quando utilizadas fontes orgânicas ou nas condições
481 em que as fontes inorgânicas foram combinadas com fontes orgânicas de nitrogênio, a
482 produção de biomassa se elevou significativamente.

483 Schnierda et al. (2014) observaram que a melhor fonte de nitrogênio para produção de
484 biomassa por *Lachancea thermotolerans* Y1240, *Metschnikowia pulcherrima* Y1337 e
485 *Issatchenkia orientalis* Y1161 foi o extrato de levedura.

486 Wu et al. (2008), Rao et al. (2013), Khani et al. (2016), também relataram os maiores
487 rendimentos de biomassa quando o extrato de levedura foi adicionado ao meio de cultivo.
488 Esses resultados estão de acordo com o presente trabalho onde todas as condições contendo
489 extrato de levedura apresentaram maiores rendimentos de biomassa.

490 Fazendo uma relação da produtividade de biomassa utilizando fontes inorgânicas e
491 fontes orgânicas, podemos concluir que, os melhores rendimentos com extrato de levedura se
492 devem a presença de aminoácidos, elementos traço e sais minerais necessários aos processos
493 anabólicos e portanto, de crescimento celular. (Wu et al., 2008; Schnierda et al., 2014). Esses
494 dados confirmam a necessidade de uma fonte orgânica de nitrogênio para obtenção de bons
495 rendimentos de biomassa.

496 **Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de EPS e biomassa utilizando** 497 **melaço de cana-de-açúcar como substrato**

498 Quando a fonte de carbono do meio foi o melaço houve uma diferença entre as
499 melhores fontes de nitrogênio na produção de EPS, de acordo com a Figura 3.

500

501

502

503

504

505

506

507

508

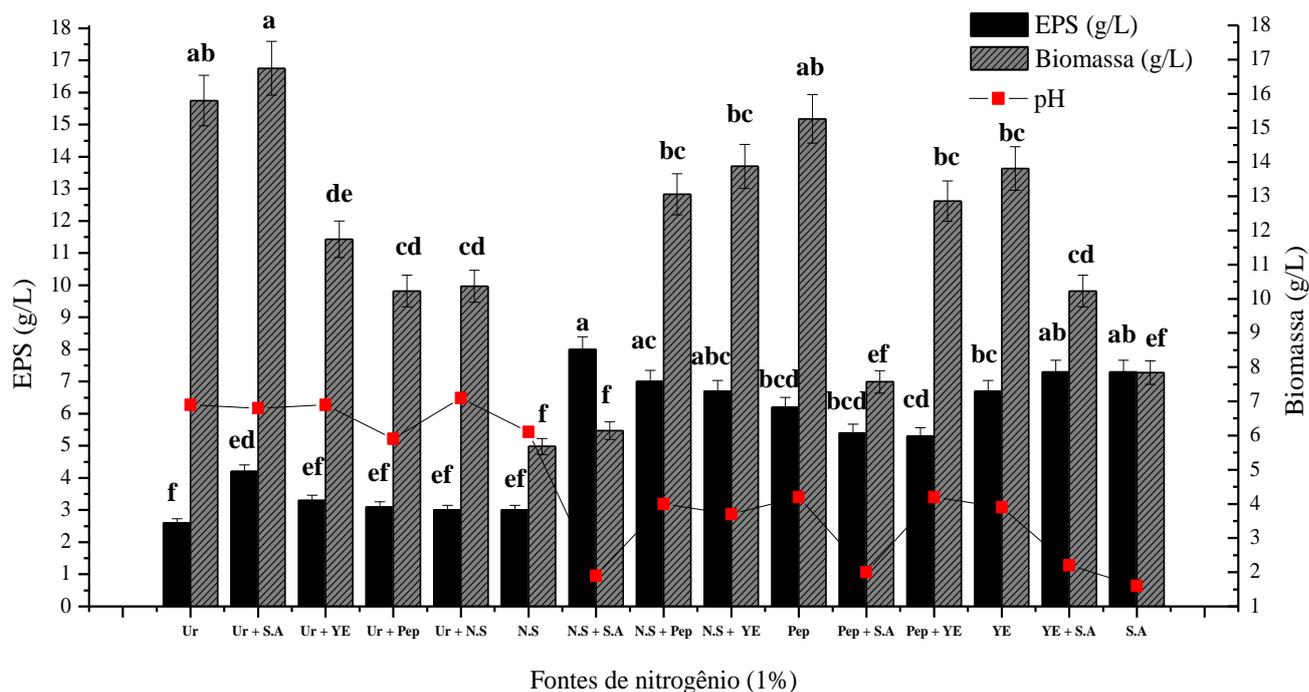
509

510

511

512

513



514

515

Figura 3: Produção de EPS (g/L), Biomassa (g/L) e variação do pH ao longo do período fermentativo de 96 horas por *C. laurentii* SD7 em diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo suplementado com melaço.

516

517

518

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukeya 5% de significância ($p < 0,05$). Ur: (Uréia); S.A:(Sulfato de amônio); Ye: (Extrato de levedura); Pep: (Peptona); NS: (Nitrato de sódio).

519

520

521

522

523

524

525

526

Inicialmente, podemos observar que, em comparação com o meio contendo sacarose, no meio com melaço de cana-de-açúcar, todos os valores de produção de EPS foram maiores, inclusive nos ensaios contendo a uréia ou fontes inorgânicas como o nitrato de sódio e o sulfato de amônio. Os maiores rendimentos de EPS, também foram maiores na combinação de nitrato de sódio com sulfato de amônio, atingindo uma produção de 8,0 g/L. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com a sacarose, na presença do melaço de cana-de-açúcar o EPS produzido na presença destes sais apresentou estabilidade após secagem e repetibilidade.

527

528

529

Isso demonstra a eficiência do melaço como fonte de carbono, tendo em vista que o mesmo pode fornecer, além de esqueletos carbônicos, diversos componentes necessários ao crescimento celular e a produção de EPS (Ergene & Avci, 2008; Sirajuniza et al., 2012)

530

531

532

533

534

Outro aspecto interessante é o pH do meio, pois a combinação do sulfato de amônio com o nitrato de sódio levou a uma acentuada queda no pH final, o que favoreceu a produção de EPS. Nos ensaios onde os pH finais ficaram mais ácidos, foi onde ocorreu as maiores produções de EPS, mostrando que a acidez é uma condição importante para isso. Por outro lado, nos meios com uréia, não ocorreu a acentuada alcalinização do meio como ocorreu com

535 sacarose. A presença do melão, em combinação com a uréia, proporcionou um efeito
536 tamponante que resultou em maior produção de EPS quando comparado com a sacarose.

537 Alguns autores já descrevem que o aporte de sais de amônio pode resultar em rápido
538 consumo pelo microrganismo resultando em uma rápida ejeção de prótons e consequente
539 acidificação do meio (Cho et al., 2001; Gientka et al., 2016).

540 **Otimização da produção de EPS**

541 Os resultados obtidos no DCCR³ mostram a influência das variáveis estudadas para a
542 produção de EPS por *C. laurentii* em 96 horas de fermentação (Tabela 5). Pode-se observar
543 que as maiores produções de EPS ocorreram nos ensaios 8,10,4, 2 e 13 com produção de EPS
544 que ficaram entre 7,12 g/L e 11,00 g/L. De acordo com as análises estatísticas, as variáveis
545 que influenciaram na produção de EPS foram o melão de cana-de-açúcar em seus termos
546 lineares e o (NH₄)₂SO₄ em seus termos quadráticos e lineares a 10% de significância (p< 0,1).

547 **Tabela 4:** Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2³ e valores das variáveis
548 independentes (X₁: melão de cana-de-açúcar, X₂: NaNO₃ e X₃: (NH₄)₂SO₄) e as respostas
549 (produção de EPS em g/L) por *C. laurentii* SD7 em fermentação submersa durante 96 horas.

550

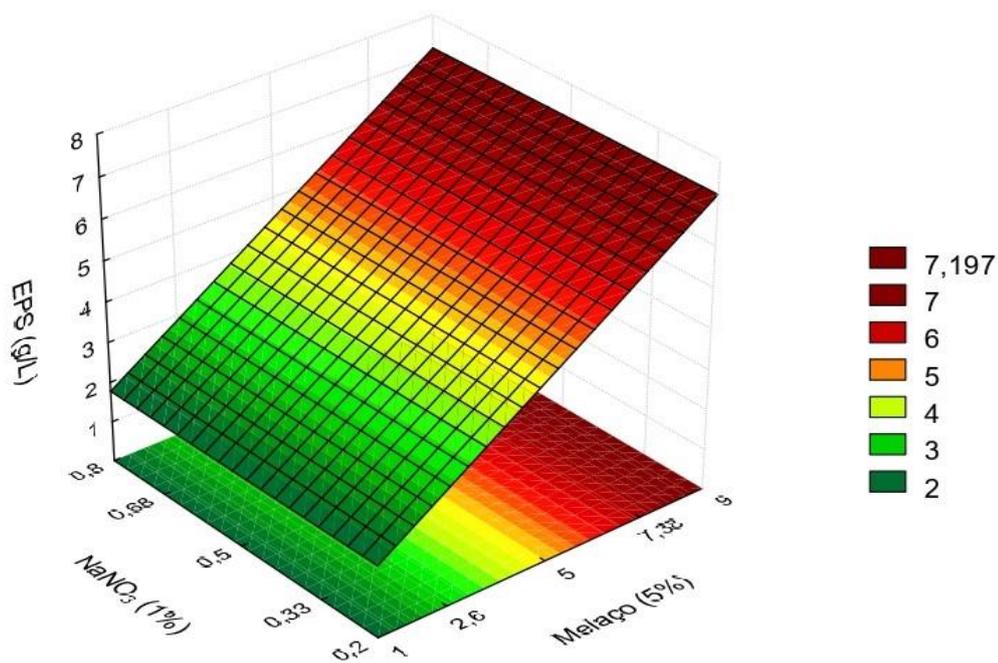
Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais			Produção de EPS (g/L)
	X ₁	X ₂	X ₃	Melão de cana-de-açúcar (%)	NaNO ₃ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	
1	-1	-1	-1	2,6	0,3	0,3	2,61
2	1	-1	-1	7,4	0,3	0,3	8,46
3	-1	1	-1	2,6	0,7	0,3	2,24
4	1	1	-1	7,4	0,7	0,3	7,60
5	-1	-1	1	2,6	0,3	0,7	3,24
6	1	-1	1	7,4	0,3	0,7	5,35
7	-1	1	1	2,6	0,7	0,7	3,57
8	1	1	1	7,4	0,7	0,7	7,12
9	-1,68	0	0	1,0	0,5	0,5	4,52
10	1,68	0	0	9,0	0,5	0,5	7,60
11	0	-1,68	0	5	0,2	0,5	4,02
12	0	1,68	0	5	0,8	0,5	4,42
13	0	0	-1,68	5	0,5	0,2	10,99
14	0	0	1,68	5	0,5	0,8	4,61
15	0	0	0	5	0,5	0,5	4,56
16	0	0	0	5	0,5	0,5	3,99
17	0	0	0	5	0,5	0,5	4,48

551

552 As Figuras 4 e 5 mostram que, quanto maior a concentração do melado de cana-de-
553 açúcar, maior foi a produção de EPS. Para o NaNO_3 , por sua vez, a faixa de concentração
554 estudada não apresentou efeitos significativos, indicando que sua variação não influenciou na
555 produção do EPS, sendo possível, desta forma, trabalhar com a concentração mais baixa deste
556 substrato (Figuras 4 e 6). Com relação ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a máxima produção de EPS ocorreu na
557 menor concentração estudada (Figuras 5 e 6).

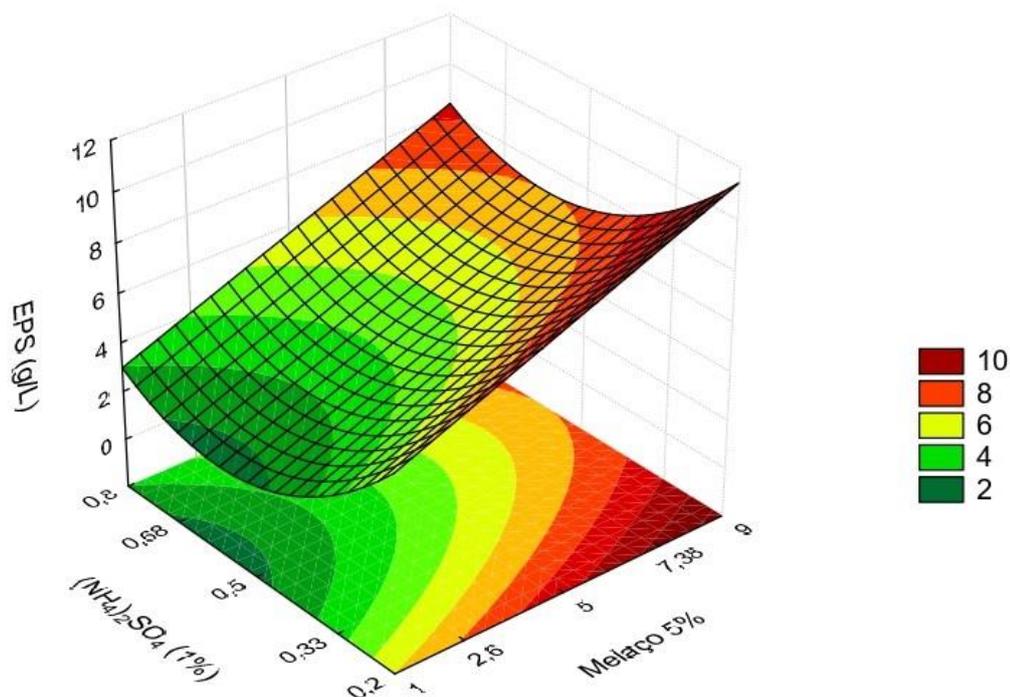
558

559 **Figura 4:** Superfície de resposta em função das diferentes concentrações de melado e NaNO_3 na produção de EPS por *C. laurentii* SD7



560

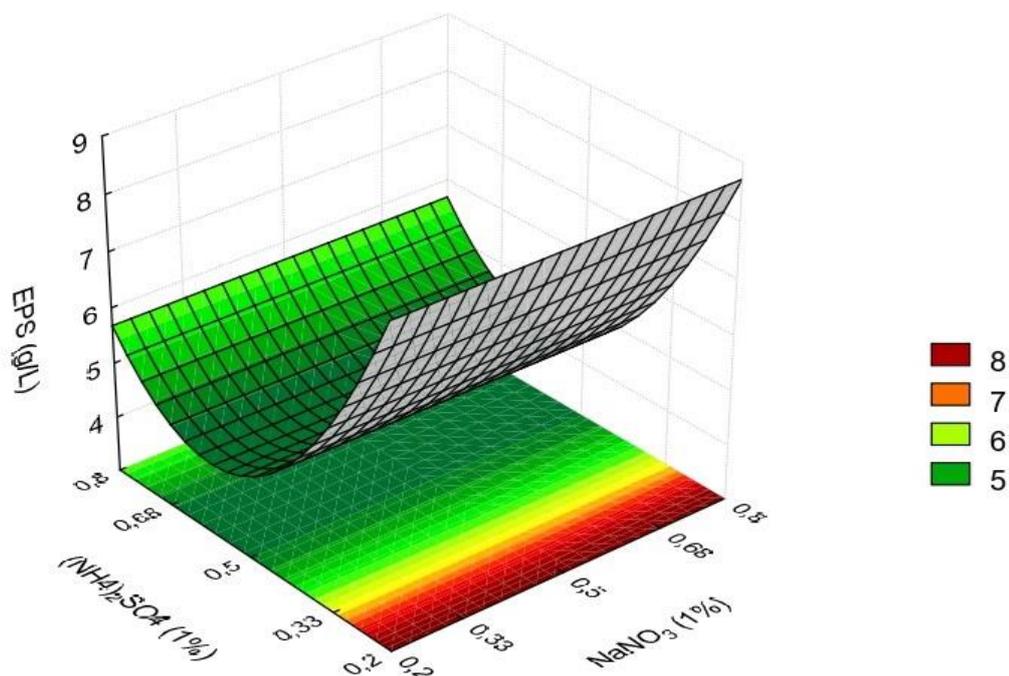
561 **Figura 5:** Superfície de resposta em função das diferentes concentrações de melação e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de EPS por *C. laurentii* SD7



562

563

564 **Figura 5:** Superfície de resposta em função das diferentes concentrações de NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de EPS por *C. laurentii* SD7



565

566 A análise dos coeficientes de regressão (Tabela 6) mostram que os únicos fatores que
 567 influenciaram na produção de EPS foram a fonte de carbono e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pois foram as
 568 únicas variáveis estatisticamente significativas no nível de confiança de 90% ($p < 0,1$). O valor
 569 de F_{calc} de 14,83 indica que os resultados foram altamente significativos e a correlação entre

570 os valores preditos e observados foi muito boa (Tabela 7). Desta forma, pode-se afirmar que
 571 os resultados se ajustam bem ao modelo e os valores dos coeficientes de regressão podem ser
 572 utilizados para gerar a equação do modelo (Equação 4):

$$573 \quad Y=4,41+1,61X_1+0,11X_2-0,90X_3+0,36X_1^2-0,28 X_2^2+0,97 X_3^2+0,11X_1X_2-0,69X_1X_3+0,41X_2X_3$$

574 **Tabela 5:** Análise de regressão da produção de EPS por *C. laurentii* SD7 em fermentação
 575 submersacom as variáveis estudadas. $R^2= 0,78$ e nível de confiança de 10%.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T (7)	p-valor
Média	4,41	0,94	4,67	0,002268
Melaço (L)	1,61	0,44	3,64	0,008276
Melaço (Q)	0,36	0,48	0,74	0,482997
NaNO ₃ (L)	0,11	0,44	0,25	0,807386
NaNO ₃ (Q)	- 0,28	0,48	- 0,59	0,571954
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	- 0,90	0,44	- 2,04	0,080691
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,97	0,48	2,00	0,085410
Melaço x NaNO ₃	0,11	0,57	0,20	0,844990
Melaço x (NH ₄) ₂ SO ₄	- 0,69	0,57	- 1,19	0,270716
NaNO ₃ x (NH ₄) ₂ SO ₄	0,41	0,57	0,72	0,494327

576

577 **Tabela 6:** Análise de variância (ANOVA) para a produção de EPS por *C. laurentii* SD7 em
 578 fermentação submersa utilizando melaço de cana-de-açúcar, NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄ como
 579 variáveis.

Fatores	SQ	GL	QM	Fc*
Regressão	58,75	2	29,37	14,83
Resíduo	27,7	14	1,98	
Falta de ajuste	27,51	11		
Erro Puro	0,19	2		
Total	86,45	16		

580 *Fc=F calculado; F_{tab}: 2,72; significativo ao nível de 10% de significância.

581

582 Além da fonte de carbono, sua concentração é um fator determinante na produção de
583 EPS. No geral, o que se observa é que valores maiores de fonte de carbono influenciam no
584 aumento da produção de EPS (Ergene & Avci, 2017; Han et al., 2018). No entanto, alguns
585 autores têm demonstrado que concentrações muito elevadas afeta a produção de EPS (Rao et
586 al., 2013; Maalej et al., 2014; Jeong et al., 2017; Abd-Alla et al., 2018; Han et al., 2018). Esse
587 fenômeno é conhecido como repressão catabólica, condição em que o crescimento microbiano
588 é favorecido e a biossíntese do subproduto é reduzida (Maalej et al., 2014). Durante a síntese
589 de EPS isso ocorre porque com o aumento da produção do metabólito, a viscosidade do meio
590 se eleva dificultando a distribuição de oxigênio e nutrientes para os microrganismos, o que faz
591 a produtividade de EPS diminuir. Entretanto, isso não foi observado no presente trabalho,
592 onde os gráficos de superfície de resposta indicam que a máxima produção de EPS em função
593 do aumento da concentração de melão ainda não foi atingida, necessitando da realização de
594 testes posteriores para a análise de concentrações mais elevadas de melão.

595 A utilização do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também tem sido demonstrada na literatura por ser
596 eficiente para a produção de EPS. De acordo com alguns autores a relação C: N para a
597 produção de EPS, influencia muito nesta produção. Enquanto valores elevados de fonte de
598 carbono são requeridos, os valores altos de nitrogênio inibem a produção de EPS devido a
599 repressão da rota metabólica de produção. Alguns autores relatam que concentrações entre 0,2
600 e 0,3 de sais inorgânicos são ideais para produção de EPS (Pavlova et al., 2004). Dessa forma,
601 esses resultados corroboram os descritos na literatura de que relações mais altas de C: N são
602 as mais ideais para a síntese de EPS microbianos.

603 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

604 A levedura *C. laurentii* SD7 apresentou potencial de síntese de EPS até 3,8 vezes
605 maior do que aqueles descritos na literatura, demonstrando que esta espécie é bastante
606 promissora para estudos futuros. Além disso, a combinação do melão de cana-de-açúcar com
607 os sais inorgânicos foi eficiente para a produção de EPS e biomassa microbiana, resultando
608 em bons rendimentos e estabilidade, permitindo a redução de custo do processo.

609 **AGRADECIMENTOS**

610 À Universidade Federal da Bahia, pela infraestrutura fornecida e à Fundação de
611 Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento da pesquisa.

612 **REFERÊNCIAS**

- 613 Abd-Alla, M., Bashandy, S. R., Nafady, N. A., & Hassan, A. A. (2018). Enhancement of
614 exopolysaccharide production by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Brevibacillus*
615 *parabrevis* isolated from root nodules of *Cicer arietinum* L. and *Vigna unguiculata* L.
616 (Walp.) plants. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 29(1), 117-129. doi:
617 10.1007/s12210-018-0671-1
- 618 Almansoor, A. F., Al-baldawi, I. A., & Hazaim, M. (2020). Optimization of the EPS
619 production of a bacterial floc consortium using different parameters. *Biocatalysis and*
620 *Agricultural Biotechnology*, 23, 101466. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101466
- 621 Cho, D. H., Chae, H. J., & Kim, E. Y. (2001). Synthesis and characterization of a novel
622 extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and*
623 *Biotechnology*, 95(3), 183-193. doi: 10.1385/abab:95:3:183
- 624 Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual*
625 *Review of Phytopathology*, 33(1), 173-197. doi: 10.1146/annurev.py.33.090195.001133
- 626 Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial
627 exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction.
628 *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083
- 629 Ergene, E., & Ayşe, A. V. C. I. (2017). Effects of cultural conditions on exopolysaccharide
630 production by *Bacillus* sp. ZBP4. *Journal of Agricultural Sciences*, 24(3), 386-393. doi:
631 10.15832/ankutbd.456666
- 632 Gientka, I., Błażej, S., Stasiak-Różańska, L., & Chlebowska-Śmigiel, A. (2015).
633 Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical
634 composition and functional properties - review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia*
635 *Alimentaria*, 14(4), 283-292. doi: 10.17306/J.AFS.2015.4.29
- 636 Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Różańska, L., Bednarska, A. A., & Błażej, S. (2016).
637 The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic*
638 *Journal of Biotechnology*, 22, 31-37. doi:10.1016/j.ejbt.2016.02.008
- 639 Goyzueta M, L. D., Nosedá, M. D., Bonatto, S. J. R., Freitas, R. A., Carvalho, J. C., & Soccol, C.
640 R. (2020). Production, characterization, and biological activity of a chitin-like EPS produced
641 by *Mortierella alpina* under submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 247, 116716.
642 doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116716

- 643 Hamidi, M., Gholipour, A. R., Delattre, C., Sedsighi, F., Seveiri, R. M., Pasdaran, A., ...
644 Karimitabar, F. (2020). Production, characterization and biological activities of
645 exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp.
646 GUMS16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 268-277. doi:
647 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.206
- 648 Han, M., Xu, J-Z., Liu, Z-M., Qian, H., & Zhang, W-G. (2018). Co-production of microbial oil
649 and exopolysaccharide by the oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch
650 culture. *RSC Advances*, 8(6), 3348-3356. doi: 10.1039/c7ra12813d
- 651 Jeong, D., Kim, D-H., Kang, II-B., Kim, H., Song, K-Y., Kim, H-S., Seo, K-H. (2017).
652 Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by
653 *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, 436-442. doi:
654 10.1016/j.foodcont.2017.02.033
- 655 Khani, M., Bahrami, A., Chegeni, A., Ghafari, M. D., & Zadeh, A. M. (2016). Optimization of
656 carbon and nitrogen sources for extracellular polymeric substances production by
657 *Chryseobacterium indologenes* MUT. 2. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(2), 13-18. doi:
658 10.15171/ijb.1266
- 659 Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal*
660 *of Basic Microbiology*, 47(2), 103-117. doi: 10.1002/jobm.200610203
- 661 Li, H., Jiang, Z., Yang, X., Yu, L., Zhang, G., Wu, J., & Liu, X. Y. (2015). Sustainable resource
662 opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of
663 Portland cement. *Journal of Cleaner Production*, 93, 56-64. doi:
664 10.1016/j.jclepro.2015.01.027
- 665 Mahapatra, S., & Banerjee, Debdulal. (2016). Production and structural elucidation of
666 exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55. *International journal of*
667 *biological macromolecules*, 82, 182-191. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.035
- 668 Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Buon, L., Heyraud, A., Nasri, M. (2015). Optimization of
669 exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS 22 and examination of its
670 metal-binding abilities. *Journal of Applied Microbiology*, 118 (2), 356-367. doi:
671 10.1111/jam.12688

- 672 Malick, A., Khodaei, N., Benkerroum, N., & Karboune, S. (2017). Production of
673 exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: Optimization of media composition to
674 maximize the yield and structural characterization. *International Journal of Biological*
675 *Macromolecules*, 102, 539-549. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.151
- 676 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.
677 *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428
- 678 Moghannem, S. A. M., Farag, M. M. S., Shehab, A. M., & Azab, M. S. (2018).
679 Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical
680 experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 452-462. doi:
681 10.1016/j.bjm.2017.05.012
- 682 Özcan, E., & Öner, E. T. (2015). Microbial production of extracellular polysaccharides from
683 biomass sources. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 161-184. doi:
684 10.1007/978-3-319-16298-0_51
- 685 Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., ... Mammi, L.
686 (2020). Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 103
687 (7), 6244-6249. doi: 10.3168/jds.2019-17644
- 688 Pavlova, K., Koleva, L., Kratchnova, M., & Panchev, I. (2004). Production and characterization
689 of an exopolysaccharide by yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4),
690 435-439. doi: 10.1023/B:WIBI.0000033068.45655.2a
- 691 Pavlova, K., Panchev, I., Krachanova, M., & Gocheva, M. (2009). Production of an
692 exopolysaccharide by Antarctic yeast. *Folia Microbiológica*, 54(4), 343. doi:
693 10.1007/s12223-009-0049-y
- 694 Pavlova, K., Rusinova-Videva, S., Kuncheva, M., Kratchanova, M., Gocheva, M., & Dimitrova,
695 S. (2011). Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by
696 Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL 100. *Applied Biochemistry*
697 *and Biotechnology*, 163(3), 1038-1052. doi: 10.1007/s12010-010-9107-9
- 698 Poli, A., Anzelmo, G., Tommonaro, G., Pavlova, K., Casaburi, A., & Nicolaus, B. (2010).
699 Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by
700 psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL 1 isolated from Livingston Island,
701 Antarctica. *Folia Microbiológica*, 55(6), 576-581. doi: 10.1007/s12223-010-0092-8

- 702 Prasannath, K. (2013). Pathogenicity and virulence factors of phyto-bacteria. *Scholars Academic*
703 *Journal of Biosciences*, 1(1), 24-33. doi:
- 704 Rao, B. P., Sudharsan, K., Kasirajan, S., Sekaranm, R. C. H. G., & Mandal, A. B. (2013).
705 Characterization of exopolysaccharide from *Bacillus amyloliquefaciens* BPRGS for its
706 bioflocculant activity. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(10),
707 1696-1704. doi:
- 708 Ravella, S. R., Quiñones, T. S., Retter, A., Heiermann, M., Amon, T., & Hobbs, P. J. (2010).
709 Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus
710 *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 728-732. doi:
711 10.1016/j.carbpol.2010.05.039
- 712 Rebelato, M. G., Madaleno, L. L., & Rodrigues, A. M. (2013). Ponderação do impacto ambiental
713 dos resíduos e subprodutos da produção industrial sucroenergética. *Revista Gestão Industrial*,
714 9(2), 392-415. doi: 10.3895/S1808-04482013000200006
- 715 Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. (2009). Planejamento de Experimentos e Otimização de
716 Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, Brasil
- 717 Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. (2015).
718 Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on
719 loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological
720 characterization of biopolymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 15-28.
721 doi: 10.1016/j.molcatb.2015.08.016
- 722 Samadlouie, H. R., Jahanbin, K., & Jalali, P. (2020). Production, medium optimization, and
723 structural characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodotorula minuta*
724 ATCC 10658. *Food Science & Nutrition*, 8(9), 4957-4964. doi: 10.1002/fsn3.1792
- 725 Santos, L., Kotovicz, V., Barana, A. C., & Almeida, M. M. (2012). Utilização de resíduos
726 agroindustriais para produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. *Revista*
727 *Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 6(1), 655-664. doi: 10.3895/S1981-
728 36862012000100004
- 729 Santos, P. S., Solidade, L. S., Souza, J. G. B., Lima, G. S., Braga Jr, A. C. R., Assis, F. G. V., &
730 Leal, P. L. (2018). Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção
731 de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4(2),
732 0181-0188. doi: 10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188

- 733 Sardari, R. R. R., Kulcinskaja, K., Ron, E. Y. C., Björnsdóttir, S., Friðjónsson, O. F.,
734 Hreggviðsson, G. O., & Karlsson, E. N. (2017). Evaluation of the production of
735 exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*.
736 *Carbohydrate Polymers*, 156, 1-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.08.062
- 737 Saxena, J., & Tanner, R. S. (2012). Optimization of a corn steep medium for
738 production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*.
739 *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1553-1561. doi: 10.1007/s11274-
740 011-0959-0
- 741 Schnierda, T., Bauer, F. F., Divol, B., Van Rensburg, E., & Görgens, J. F. (2014). Optimization
742 of carbon and nitrogen medium components for biomass production using
743 non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 478-485. doi:
744 10.1111/lam.12217
- 745 Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., & Techapun, C. (2011). Exopolysaccharide production by
746 *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the
747 effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Sonklanakarin Journal of Science and*
748 *Technology*, 33 (4), 379. doi:
- 749 Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., & Kannan, V. R. (2018). Evaluation of the
750 production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula sp.* strain
751 CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*,
752 121, 55-62. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016
- 753 Silva, M. L. C., Martinez, P. P., Izeli, N. L., Silva, I. R., Vasconcelos, A. F. D., Cardoso, M. S.,
754 ... Barbosa, A. M. (2006). Caracterização química de glucanas fúngicas e suas
755 aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, 29(1), 85-92. doi: 10.1590/S0100-
756 40422006000100017
- 757 Sirajunnisa, A., Vijayagopal, V., & Viruthagiri, T. (2012). Effect of synthetic carbon substrates
758 and cane molasses, an agro waste on exopolysaccharide production by *P. fluorescens*.
759 *International Journal of Science and Engineering Applications*, 1 (1), 60-66. doi:
760 10.7753/IJSEA0101.1010
- 761 Soukoulis, C., & Tzia, C. (2018). Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial
762 sucrose substitutes in chocolate ice cream: A feasibility study. *International Dairy Journal*,
763 76, 18-29. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.08.004

- 764 Srikanth, S., Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumar, C., Jaganathan, M. K.,
765 & Tamilarasan, K. (2014). Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and
766 biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocatalysis and Agricultural*
767 *Biotechnology*, 3(3), 7-12. doi: 10.1016/j.bcab.2013.11.011
- 768 Woiciechowski, A. L., Carvalho, J. C., Spier, M. R., & Habu, S. (2013). Emprego de resíduos
769 agroindustriais em bioprocessos alimentares. In A. L. Woiciechowski, J. C. Carvalho, M. R.
770 Spier, & S. Habu. (Ed.), *Biotecnologia de Alimentos*, (p. 143-172). São Paulo, SP: Atheneu.
- 771 Wu, C-Y., Liang, Z-C., Lu, C-P., & Wu, S-H. (2008). Effect of carbon and nitrogen sources on
772 the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of
773 *Pleurotuscitrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(2), 61-67. doi:
774 10.38212/2224-6614.2364
- 775 Wu, Z., Yang, Z., Gan, D., Fan, J., Dai, Z., Wang, X., ... Zeng, X. (2014). Influences of carbon
776 sources on the biomass, production and compositions of exopolysaccharides from
777 *Paecilomyceshepiali* HN1. *Biomass and Bioenergy*, 67, 260-269. doi:
778 10.1016/j.biombioe.2014.05.008
- 779 Xu, C., Yu, J., Zhao, S., Wu, S., He, P., Jia, X., ... Mao, D. (2017). Effect of carbon source on
780 production, characterization and bioactivity of exopolysaccharide produced by *Phellinus*
781 *vaninii* Ljup. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(3), 2033-2041. doi:
782 10.1590/0001-3765201720150786
- 783 Xu, K., & Xu, P. (2014). Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on
784 cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*, 153, 23-29. doi:
785 10.1016/j.biortech.2013.11.057
- 786 Xu, S., Hao, N., Xu, L., Liu, Z., Yang, M., Li, Y., & Ouyang, P. (2015). Series fermentation
787 production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium*
788 *glutamicum*. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 177-182. doi: 10.1016/j.bej.2015.03.017
- 789 Zhou, K., Zeng, Y., Yang, M., Chen, S., He, L., Ao, X., ... Liu, S. (2016). Production,
790 purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-
791 25. *Carbohydrate Polymers*, 144, 205-214. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.02.067
- 792
- 793

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi possível observar que a levedura *C. laurentii* SD7 apresentou potencial de síntese de EPS até 3,8 vezes maior do que aqueles descritos na literatura, demonstrando que esta espécie é bastante promissora para estudos futuros.

O melaço de cana-de-açúcar com os sais inorgânicos foi eficiente para a produção de EPS e biomassa microbiana, resultando em bons rendimentos, o que permitiu a redução dos custos do processo.

O delineamento experimental mostrou que o melaço de cana de açúcar foi eficiente em sua maior concentração. Em contrapartida, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ influenciou na produção de EPS em sua menor concentração testada, demonstrando que, uma maior relação C: N é a ideal para a biossíntese de EPS. O NaNO_3 , por sua vez, não foi estatisticamente significativo a 10% de significância.