

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PEDRO ROMEL NASCIMENTO HERBAY

Avaliação das condições de cultivo de *Aureobasidium pullulans* e do efeito da luz visível  
sobre a produção de pululana em meio baseado em glicose

Lorena

2020



PEDRO ROMEL NASCIMENTO HERBAY

Avaliação das condições de cultivo de *Aureobasidium pullulans* e do efeito da luz visível sobre a produção de pululana em meio baseado em glicose

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração em Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Júlio César dos Santos

Versão original

Lorena

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento Herbay, Pedro Romel

Avaliação das condições de cultivo de *Aureobasidium pullulans* e do efeito da luz visível sobre a produção de pululana em meio baseado em glicose / Pedro Romel Nascimento Herbay; orientador Júlio César dos Santos - Versão Original. - Lorena, 2020.  
103 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Pululana. 2. Exopolissacarídeo. 3. Densidade de fluxo de fótons. 4. Melanina. I. Título. II. dos Santos, Júlio César, orient.

*Pelo grande sacrifício que fizeram por mim,*

*é uma honra poder dedicar este trabalho*

*para Romel Nascimento Panaifo e*

*Carmen Nascimento Herbay,*

*minha família.*



## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força de cada dia, por cada oportunidade, por cada aprendizado, por cada pessoa que colocou no meu caminho e que foi somando com cada experiência nova, o começo foi difícil, mas com o decorrer dos meses, os dias tornaram-se maravilhosos;

Ao **Prof. Dr. Júlio César dos Santos**, pela orientação, compromisso, dedicação e amizade. Obrigado pela fé colocado no meu trabalho e em mim, as suas palavras trouxeram conforto nos momentos difíceis, tanto durante o desenvolvimento das atividades no laboratório quanto no crescimento profissional e pessoal, aprendi mais do que eu imaginei antes de chegar ao Brasil e vou de volta pra o Peru com uma sólida base científica, acadêmica e pessoal, formada com seu apoio, você foi e será meu mestre e amigo;

Ao **Dr. Ruly Terán Hilares**, quem acreditou em mim desde antes de começar o mestrado, sem ter me conhecido antes, colocou sua fé e me brindou sua amizade, me permitiu conhecer o maravilhoso campo da biotecnologia, e me inspirou para continuar explorando novas aplicações, inovar e empreender em cada atividade, tanto pessoal quanto profissional, muito obrigado;

À **Profa. Dra. Talita Martins Lacerda**, por cada sugestão e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, sua contribuição foi muito importante e muito apreciada;

Ao **Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva**, pelo conhecimento compartilhado, apoio e liberdade que me deu para poder desenvolver parte da minha pesquisa no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios), muito obrigado;

À **Dra. Talita Ferreira M. da S. Fernandes**, meu profundo carinho, respeito e admiração, não só contribuiu no meu desenvolvimento e aperfeiçoamento profissional e científica, foi além, tornando-se em uma amiga que me brindou sua confiança, seu apoio e junto a sua preciosa família, me tenderam a mão no momento de maior tristeza pessoal, obrigado Talita;

Aos meus amigos que considero como uma segunda família **Verônica Távilla Ferreira Silva, Marcos Felipe Russo Assumpção Schmidt, Josman Andrey Velasco Mendoza, Leidy Patricia Quintero Mora e Samara Cardoso Alves**, eu agradeço por cada dia que compartilharam comigo, tanto bons quanto ruins, foram o meu suporte emocional nos dias difíceis e preencheram de alegria cada momento do meus dias, me sinto muito grato e orgulhoso por ter conhecidos todos vocês. Estarão sempre no meu coração e na minha mente;

Aos meus amigos e primeira família formada em uma república **Awana da Silva Lima, Renan Rodriguez Ferreira da Silva e Vinicius Dias**, ainda lembro do dia que cheguei na república, vocês me receberam com muito carinho e amor, me deram as boas-vindas, e mesmo depois de ter terminado a república, nós ainda nos encontramos e compartilhamos muitos sorrisos e piadas. Por sempre no meu coração amigo;

Um profundo agradecimento aos integrantes da república da Marsela e o Cairo, fico grato por ter conhecido a **Elaine Galhardo, Fernando Antônio Pereira Junior, Leon Balloni Gomes e Paulo Vitor Henrique**, foram como uma família, vou sentir saudade das noites de esfiha, as pipocas e os filmes, as conversas de ciência e tecnologia, política e atualidade, os jogos de mesa, foram uma ótima companhia na época de pandemia, muito obrigado amigos;

Aos estudantes e colegas **Maria Teresa Ferreira Ramos Raymundo** e **Paulo Antônio Ferreira Hummel Pinto Fernandes**, agradeço pela sua companhia e apoio, tanto dentro do laboratório quanto fora deste. Seus sorrisos, seus pensamentos, cada aventura, cada anedota estarão no meu coração e mente;

Ao meu colega, estudante de iniciação científica e amigo **Yuri Tanaka Mühlbauer**, por auxiliar-me em cada experimento realizado nesta pesquisa, sua contribuição permitiu obter informação muito importante, obrigado Yuri;

À **M.Sc. Barbara Pereira**, o seu profissionalismo, dedicação e compromisso apenas é superado pela sua amizade, qualidade de pessoa e amiga, obrigado por ter me ajudado com a escrita e com os ensaios de caracterização da pululana, assim como pela sua amizade, muito obrigado;

A minhas amigas **Layde Teixeira de Carvalho** e **Tatiane Thais de Pierre**, pela ajuda e contribuição na caracterização das amostras de pululana obtida nos experimentos, muito obrigado, ficou grato por ter conhecido vocês e por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e principalmente seus sorrisos;

Aos integrantes do **Laboratório de Biopolímero, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM)**, liderados pelo **Dr. Júlio César dos Santos** e **Dra. Talita Martins Lacerda**, foram como uma família pra mim, me receberam e acolheram como um membro mais da equipe, eu percebi que a união, compromisso e companheirismo são coisas muito importante, eu disfrutei das alegrias e sorrisos de todos. Fico grato por ter conhecidos todos vocês;

Aos integrantes do **Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios)**, liderado pelo **Dr. Silvio Silvério da Silva**, agradeço de todo coração por ter me ajudado em cada experimento realizado nos ambientes do LBios, obrigado pelas sugestões;

Eu tive muita sorte de poder conhecer muitas pessoas na EEL-USP, que me motivaram a continuar com a luta que significar fazer um mestrado longe de casa, em outro país e com um idioma diferentes, no entanto, o caminho foi divertido, muito obrigado;

Ao **Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo**, por sua estrutura educacional de alta qualidade, com docentes de ampla experiência acadêmica e científica, que souberam transmitir cada conhecimento, motivando cada dia a alcançar as metas e cumprindo os objetivos com paciência, dedicação, compromisso e fé de que nosso trabalho vai aportar avanços importantes para o Brasil e para a sociedade, muito obrigado;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, muito obrigado;

Ao **Centro de Estudo de Insetos Sociais (CIES/UNESP-Brasil)** por doar gentilmente as cepas de *Aureobasidium pullulans* LB83 e *Aureobasidium pullulans* 15.2, micro-organismo utilizados neste trabalho, muito obrigado;

Ao **Programa de Nacional de Becas y Credito Educativo (PRONABEC)**, órgão de financiamento de bolsa de estudo do Perú, quem deram o bolsa de estudo para realizar o mestrado em Biotecnologia Industrial na Universidade de São Paulo – Brasil, obrigado pela

oportunidade de poder aprender e conhecer uma nova cultura. Com todas as habilidades adquiridas pretendo contribuir com o desenvolvimento do meu país, muito obrigado;

Ao “*Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), sede Madre de Dios*”, minha segunda família científica no Perú, toda a minha experiência e motivação foram adquiridas e formadas durante todo o tempo que trabalhei e compartilhei no IIAP, e em especial, ao **M.Sc. Ronald Corvera Gomringer**, e a **Jenny Gomez Ruiz**, quem me deram sua amizade, compreensão e me ensinaram muitas coisas que agora estou aplicando na minha vida profissional e pessoal. Muito obrigado.



## RESUMO

NASCIMENTO, P. R. **Avaliação das condições de cultivo de *Aureobasidium pullulans* e do efeito da luz visível sobre a produção de pululana em meio baseado em glicose.** 2020. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Os polímeros de origem microbiana têm recebido atenção da comunidade científica e da sociedade devido a sua versatilidade e diversidade de aplicações industriais, correspondendo a alternativa sustentável e ecologicamente amigável. Entre os biopolímeros, a pululana, um exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, destaca-se por suas características, sendo um material não tóxico, não mutagênico, não cancerígeno, biocompatível, correspondendo ainda a um ingrediente não calórico quando usado na dieta humana. No bioprocessamento de obtenção de pululana, no entanto, há a produção concomitante do pigmento melanina, o que corresponde a uma desvantagem, pois a remoção deste pigmento agrega custo ao biopolímero. A pululana corresponde também a uma alternativa interessante para incorporação a uma biorrefinaria de materiais lignocelulósicos, sendo importante, para o caso de um futuro aproveitamento da fração celulósica destes materiais, o estabelecimento de condições de cultivo em meio baseado em glicose. Neste contexto, no presente trabalho, avaliou-se, com auxílio de planejamento estatístico, o efeito de variáveis importantes para produção de pululana em meio baseado em glicose comercial, sendo avaliada também o efeito da incidência de luz visível sobre a produção de pululana e melanina. As fermentações foram conduzidas a 28 °C e 200 rpm em frascos Erlenmeyer contendo meio baseado em glicose, empregando extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Após a análise dos resultados obtidos com a cepa *A. pullulans* LB83, observou-se instabilidade na produção de pululana e biomassa e, assim, procedeu-se com a avaliação de outras cepas selvagens desta espécie microbiana, resultando na seleção da linhagem *A. pullulans* ATCC 42023. Do planejamento experimental obteve-se um modelo matemático adequado para produção de pululana e, após otimização das condições de cultivo e reajuste de pH inicial e tempo de processo, determinou-se que 126,2 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura, pH inicial 5,00 e 168h de processo correspondiam às condições que maximizavam a produção do biopolímero ( $51,64 \pm 3,86$  g/L de pululana). Com as condições otimizadas, realizaram-se ensaios variando condições de iluminação, empregando-se luz LED de diferentes comprimentos de onda, iluminação do laboratório com lâmpadas fluorescente e sob ausência de luz. A máxima produção de pululana ( $57,94 \pm 0,31$  g/L) de cor branca opaca e com menor teor de melanina ( $1,80 \pm 0,06$  UA<sub>540nm</sub>/g de pululana), foi observada sob luz LED branca com densidade de fluxo de fótons de 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ . As evidências indicam potencial de aplicação da luz LED branca para produção de pululana por *A. pullulans*, possibilitando a redução dos custos com remoção do pigmento melanina empregando-se cepa microbiana selvagens.

**Palavras-chave:** Pululana. Exopolissacarídeo. Densidade de fluxo de fótons. Melanina



## ABSTRACT

Nascimento, P. R. **Evaluation of the cultivation conditions of *Aureobasidium pullulans* and of the effect of visible light on the production of pullulan in a glucose-based medium.** 2020. 103 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Polymers of microbial origin have received attention from the scientific community and from the society due to their versatility and diversity of industrial applications, corresponding to a sustainable and ecologically friendly alternative. Among biopolymers, pullulan, an exopolysaccharide produced by the fungus *Aureobasidium pullulans*, stands out for its characteristics, being a non-toxic, non-mutagenic, non-carcinogenic, biocompatible material, also corresponding to a non-caloric ingredient when used in the human diet. However, in the bioprocess of obtaining pullulan, there is the concomitant production of the melanin pigment, which corresponds to a disadvantage, since the removal of this pigment adds cost to the biopolymer. Pullulan is also an interesting alternative to be incorporated in a biorefinery of lignocellulosic materials, and thus, considering a future use of the cellulosic fraction of these materials, the establishment of conditions for cultivation in a glucose-based medium is important. In this context, in the present work, the effect of important variables for the production of pullulans in a medium based on commercial glucose was evaluated using statistical design as a tool, also evaluating the effect of incidence of visible light on the production of pullulan and melanin. Fermentations were carried out at 28 °C and 220 rpm in Erlenmeyer flasks containing glucose-based medium, using yeast extract as a nitrogen source. After the analysis of the results obtained with the strain *A. pullulans* LB83, instability in the production of pullulan and biomass was observed and, thus, other wild strains of this microbial species were evaluated, resulting in the selection of the strain *A. pullulans* ATCC 42023. From the experimental design, an adequate mathematical model was obtained for the production of pullulan, and the optimization of the culture conditions and adjustment of the initial pH and process time indicated that 126.2 g/L of glucose, 2.66 g/L of yeast extract, initial pH 5.00 and 168h of the process corresponded to the conditions that maximized the production of the biopolymer ( $51,64 \pm 3,86$  g/L of pullulan). Using the optimized condition, tests were performed varying lighting conditions, using LED light of different wavelengths, besides laboratory lighting with fluorescent lamps and the absence of light. The maximum production of pullulan ( $57.94 \pm 0.31$  g/L) of opaque white color and with lower melanin content ( $1.80 \pm 0.06$  UA<sub>540nm</sub>/g of pullulan), was observed under white LED light with photon flux density of 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . The evidence indicates the potential for application of white LED light in the process of production of pullulans by *A. pullulans*, turning possible to reduce the cost of removing the melanin pigment using wild microbial strains.

**Keywords:** Pullulan. Exopolysaccharide. Photon flux density. Melanin.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Distribuição das capas de pululana, $\beta$ -glucana e melanina em <i>A. pullulans</i> .....  | 30 |
| Figura 2 – Estrutura química da pululana representadas por unidades de maltotriose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ .....   | 31 |
| Figura 3 – Aspecto morfológico de <i>A. pullulans</i> .....  | 33 |
| Figura 4 – Via metabólica para produção da pululana.....   | 35 |
| Figura 5 – Síntese do dihidroxinaftaleno-melanina (DHN-melanina) em fungo, com sitio específico de inibição para cada enzima em cada estágio (letras cor vermelha), sendo Ce: cerulenina, Tr: triciclazol (compostos como clobentiazona, pyroquilon, ftaeto, álcool pentaclorobenzílico e cumarina podem substituir ao triciclazol) , Ca: carpropamida. [H] reação de redução, [O] reação de oxidação. ....                                  | 42 |
| Figura 6 – Etapas realizadas no presente projeto para determinar as condições ótimas de concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial de cultura para produção de pululana por <i>A. pullulans</i> , assim como avaliação do efeito das condições de iluminação visado a maximizar a produção de pululana e reduzir a síntese de melanina. ....  | 46 |
| Figura 7 – Recipientes para os experimentos com fita LED: a) recipiente com fita LED 5050 RGB no interior, b) esquema do sistema de circulação de ar (fluxo de ar representado com setas em cores), c) distribuição dos recipientes com os frascos Erlenmeyer sobre a superfície da incubadora rotatória com o comprimento de onda de luz e densidade de fluxo de fótons segundo as condições indicadas na seção 4.7. ....                   | 50 |
| Figura 8 – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de pululana (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,d) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose de 105 g/L).....                                  | 58 |
| Figura 9 – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de biomassa (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,d) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose de 105 g/L).....                                  | 61 |
| Figura 10 – Micrografias de <i>A. pullulans</i> LB83 cultivado em meio baseado em glicose comercial e extrato de levedura, com razão mássica C/N de 190 (95 g/L de glicose e 2 g/L de extrato de levedura), em pH inicial de 7,00 e 96h de processo. Destaca-se presença de: a) estruturas unicelulares (clamidósporo, blastosporo e célula “inchada”), b) pseudo-hifa e c) hifa. Microscópio óptico com fator de magnificação de 400x. .... | 62 |
| Figura 11 – Perfil cinético de formação de pululana, biomassa e pH final obtidos no cultivo com as cepas a) <i>A. pullulans</i> LB83, b) <i>A. pullulans</i> 15.2, c) <i>A. pullulans</i> ATCC 42023 e d) <i>A. pullulans</i> ATCC 9348. Concentração de inoculo: 1 g/L.....   | 64 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 12 – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de pululana (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,f) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose 105 g/L).....   | 70 |
| Figura 13 – Produção de biomassa prevista pelo modelo de segundo grau (linha preta) e dados experimentais de concentração de biomassa (quadrado preto) apresentados na Tabela 10. ....  | 72 |
| Figura 14 – Experimentos realizados nas condições otimizadas de concentração de glicose (126,23 g/L) e concentração de extrato de levedura (2,66 g/L): a) Perfil cinético de formação de pululana e biomassa (pH inicial de 6,00), b) Produção de pululana e biomassa em 96h de processo em 3 diferentes níveis de pH inicial. ....   | 75 |
| Figura 15 – Experimento realizado em triplicata (média ± desvio padrão) em frasco Erlenmeyer sob luz branca fluorescente (3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), empregando as condições otimizadas de concentração de glicose (126,23 g/L) e concentração de extrato de levedura (2,66 g/L), variando pH inicial do meio de cultura (4,00; 5,00; 6,00) e tempo de fermentação (144 e 168h). Concentração de inóculo: 1,35 ± 0,02. ....   | 76 |
| Figura 16 – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 168h de processo, com cinco diferentes condições de iluminação: Luz LED azul (com densidade de fluxo de fótons de 442, 221 e 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), escuro (0 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente (3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimentos realizados em frascos Erlenmeyer em triplicata (média ± desvio padrão). Concentração de inóculo (g/L): 1,32 ± 0,05....   | 78 |
| Figura 17 – Produção do pigmento melanina (a) expressa em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero ( $\text{UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$ de pululana) medidas em uma solução aquosa de pululana (12 g/L) obtida em 168h de processo com incidência de cinco diferentes condições de iluminação: Luz LED azul com densidade de fluxo de fótons de 442, 221 e 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , no escuro (0 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e sob luz branca fluorescente (3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimentos realizados em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média ± desvio padrão). Concentração de inóculo: 1,32 ± 0,05. São apresentadas também fotografias (b) de cada solução de pululana obtida. .... | 80 |
| Figura 18 – Representação da estrutura da pululana (A) e Espectro de FTIR (B) da pululana produzida sob a incidência de: a) luz branca fluorescente (linha verde), b) luz LED azul (linha azul), e c) pululana comercial (linha vermelha). As amostras de pululana foram produzidas nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 168h de processo. ....   | 82 |
| Figura 19 – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) com coleta de amostras cada 24h (a partir de 96h até o término do processo, em 168h), em duas condições de iluminação: Luz LED azul (221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente (3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados apresentados como média ± desvio padrão). ....   | 83 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 20 – Formação do pigmento melanina (a) expresso em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero ( $UA_{540nm}/g$ de pululana) medida em uma solução de pululana (12 g/L). Biopolímero produzido nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) com amostras coletadas cada 24h (a partir de 96h até o término do processo, em 168h), em duas condições de iluminação: Luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (média $\pm$ desvio padrão). Também são apresentadas fotografias (b) de cada amostra de pululana obtida em cada 24h (a partir de 96h até o término do processo, em 168h)..... | 84 |
| Figura 21 – Espectros de $\text{RMN}^1\text{H}$ da pululana comercial (a) e das produzidas nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 120h de processo, em duas condições de iluminação: b) luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e c) luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). .....  | 86 |
| Figura 22 – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168 h, com quatro diferentes condições de iluminação: Luz LED branca (100, 50 e $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão). .....   | 87 |
| Figura 23 – Produção do pigmento melanina expresso em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero ( $UA_{540nm}/g$ de pululana) medida em uma solução de pululana (12 g/L). O biopolímero foi produzido nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168h, com incidência de quatro diferentes condições de iluminação: Luz LED branca (100, 50 e $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão). .....  | 88 |
| Figura 24 – Fotografias da pululana produzidos nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168h, com incidência de luz LED azul (442, 221 e $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (a,b,c), escuro ( $0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (d), luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (e) e luz LED branca (100, 50 e $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (f, g, h). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão). .....  | 91 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Macromoléculas encontradas naturalmente e suas funções. ....   | 28 |
| Tabela 2 – Exopolissacarídeos microbianos disponíveis no mercado. ....  | 29 |
| Tabela 3 – Produção de pululana utilizando diferentes fontes de carbono. ....   | 37 |
| Tabela 4 – Variáveis e níveis avaliados no planejamento estatístico realizado para determinar a influência dos fatores sobre a produção de pululana e biomassa por <i>A. pullulans</i> . ....   | 48 |
| Tabela 5 – Matriz do planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central (valores codificados entre parêntesis) com variáveis independentes (concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial), razão mássica C/N e variáveis respostas de cada ensaio. Dados correspondentes a 96h de processo. Concentração de inóculo (g/L): $1,16 \pm 0,01$ . ... | 54 |
| Tabela 6 – Efeito estimado, erro padrão (EP) e <i>p</i> -valor para as respostas concentração de pululana e de biomassa obtidos pela análise estatística dos resultados do planejamento experimental Box Behnken. ....  | 55 |
| Tabela 7 – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de pululana (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. ....  | 56 |
| Tabela 8 – ANOVA para um modelo reduzido com interação de dois fatores para produção de biomassa (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. ....   | 59 |
| Tabela 9 – Condições otimizadas de produção de pululana, resultados previstos pelos modelos empíricos para produção de pululana e biomassa e resultados obtidos em dois experimentos de validação realizados, cada um, em triplicata por 96h de processo e com razão C/N correspondente a 103,31. ....  | 63 |
| Tabela 10 – Matriz do planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central (valores codificados entre parêntesis) com variáveis independentes (concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial), razão mássica C/N e variáveis resposta de cada ensaio. Dados correspondentes a 96h de processo. Concentração de inóculo (g/L): $1,32 \pm 0,74$ . ... | 66 |
| Tabela 11 – Efeito estimado, erro padrão (EP) e <i>p</i> -valor para as respostas concentração de pululana e de biomassa obtidos pela análise estatística dos resultados do planejamento experimental Box Behnken. ....   | 67 |
| Tabela 12 – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de pululana (g/L) em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. ..  | 69 |
| Tabela 13 – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de biomassa (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. .  | 71 |
| Tabela 14 – Condições otimizadas para produção de pululana, resultados previstos pelos modelos empíricos para produção de pululana e biomassa e resultados obtidos em dois experimentos de  |    |

|  |    |
|--|----|
| validação realizados, cada um em triplicata com 96h de processo e com razão C/N correspondente a 189,82. ....  | 73 |
| Tabela 15 – Fatores de rendimento de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos nas condições ótimas do modelo empírico segundo experimento de validação, com 96h de processo. ....   | 74 |
| Tabela 16 – Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos nas condições ótimas de concentração de glicose (126,23 g/L) e de extrato de levedura (2,66 g/L), variando-se o pH inicial do meio de cultura e o tempo de processo. ....      | 77 |
| Tabela 17 – Parâmetros de transformação de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos em 168h de processo nos experimentos com diferentes condições de iluminação.....  | 79 |
| Tabela 18 – Parâmetro reológico do sobrenadante obtido após separação das células em cada experimento realizado com a cepa <i>A. pullulans</i> ATCC 42023 (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em diferentes condições de processo. .... | 89 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>ATCC</b>               | <i>American Type Culture Collection</i>                     |
| <b>Ca</b>                 | Carpropamida  |
| <b>Ce</b>                 | Cerulenina  |
| <b>CoA</b>                | Coenzima A  |
| <b>DBP</b>                | Di-n-butil ftalato  |
| <b>DHN</b>                | Dihidroxi-naftaleno   |
| <b>DHN</b>                | 1,8-dihidroxi-naftaleno                                     |
| <b>DMSO-d<sub>6</sub></b> | Dimetilsulfóxido deuterado                                  |
| <b>DOPA</b>               | 3,4-dihidroxi-fenilalanina                                  |
| <b>EEL</b>                | Escola de Engenharia de Lorena                              |
| <b>EPS</b>                | Exopolissacarídeo   |
| <b>FTIR</b>               | Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier |
| <b>GDHB</b>               | $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxi-benzeno                  |
| <b>HGPE</b>               | Polietileno de alta densidade                               |
| <b>HPLC</b>               | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                    |
| <b>LDPE</b>               | Polietileno de baixa densidade                              |
| <b>LLDPE</b>              | Polietileno linear de baixa densidade                       |
| <b>LPh</b>                | Hidroperóxido lipídico                                      |
| <b>Mw</b>                 | Massa molar   |
| <b>PET</b>                | Polietileno tereftalato                                     |
| <b>PHA</b>                | Polihidroxi-álcanoatos                                      |
| <b>PKS</b>                | Policetídeo sintase   |
| <b>PLA</b>                | Ácido polilático  |
| <b>PP</b>                 | Polipropileno   |
| <b>PVC</b>                | Policloreto de vinila                                       |
| <b>Smf</b>                | Fermentação submersa  |
| <b>Ssf</b>                | Fermentação em estado sólido                                |
| <b>THN</b>                | 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno                              |
| <b>Tr:</b>                | Triciclazol   |
| <b>UDPG</b>               | Uridina difosfoglicose                                      |
| <b>USP</b>                | Universidade de São Paulo                                   |
| <b>vvm</b>                | Volume de ar por volume de meio, por minuto                 |



## SUMÁRIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1      | INTRODUÇÃO .....   | 25 |
| 2      | REVISÃO DA LITERATURA.....   | 28 |
| 2.1    | Biopolímeros .....   | 28 |
| 2.2    | Pululana e suas aplicações.....  | 29 |
| 2.3    | Variabilidade morfológica do <i>Aureobasidium pullulans</i> : formas celulares e influência das condições de cultivo.....          | 32 |
| 2.4    | Biossíntese da pululana por <i>A. pullulans</i> .....  | 35 |
| 2.5    | Fatores que influenciam na produção da pululana .....  | 36 |
| 2.5.1  | Fonte de carbono .....   | 36 |
| 2.5.2  | Fonte de nitrogênio e relação C/N.....   | 37 |
| 2.5.3  | Temperatura .....  | 38 |
| 2.5.4  | pH.....  | 38 |
| 2.5.5  | Aeração .....  | 39 |
| 2.6    | Produção da pululana em diferentes configurações de processo fermentativo .....  | 39 |
| 2.7    | Produção concomitante do pigmento melanina com a pululana .....  | 41 |
| 2.8    | Aplicação de diferentes condições de iluminação sobre o metabolismo microbiano .....   | 43 |
| 3      | OBJETIVOS .....  | 45 |
| 3.1    | Objetivo geral.....  | 45 |
| 3.2    | Objetivos específicos.....   | 45 |
| 4      | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 46 |
| 4.1    | Micro-organismo e preparo do inóculo.....  | 47 |
| 4.2    | Preparo do meio e processo de fermentação para cultivo em condições de luz branca fluorescente, luz LED azul e luz LED branca..... | 47 |
| 4.3    | Avaliação das condições de cultivo empregando planejamento de experimentos tipo Box-Benhken .....                                  | 48 |
| 4.4    | Seleção de micro-organismo. ....   | 48 |
| 4.5    | Ajuste no tempo de cultivo e pH inicial após otimização por planejamento experimental. ....  | 49 |
| 4.6    | Sistema empregado nos experimentos realizados sob diferentes condições de iluminação .....   | 49 |
| 4.7    | Avaliação dos efeitos das condições de iluminação sobre a produção de pululana, biomassa e melanina .....                          | 50 |
| 4.8    | Recuperação da pululana e biomassa .....   | 50 |
| 4.9    | Análise estatística.....   | 51 |
| 4.10   | Cálculo da razão mássica C/N.....  | 51 |
| 4.11   | Caracterização do sobrenadante e da pululana recuperada. ....  | 51 |
| 4.11.1 | Determinação da concentração de glicose no sobrenadante.....   | 51 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.11.2 | Viscosidade aparente do sobrenadante .....  | 52 |
| 4.11.3 | Análise FTIR da pululana .....  | 52 |
| 4.11.4 | Análise RNM <sup>1</sup> H da pululana .....  | 53 |
| 4.11.5 | Quantificação do pigmento melanina .....  | 53 |
| 5      | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 54 |
| 5.1    | Produção de pululana a partir de meio baseado em glicose comercial empregando a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> LB83 .....  | 54 |
| 5.1.1  | Avaliação das condições de cultivo empregando planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken.....   | 54 |
| 5.1.2  | Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de pululana em função das variáveis estudadas.....   | 56 |
| 5.1.3  | Análises de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de biomassa em função das variáveis estudadas .....   | 59 |
| 5.1.4  | Otimização da produção de pululana por <i>A. pullulans</i> LB83 .....   | 63 |
| 5.2    | Avaliação de diferentes cepas de <i>A. pullulans</i> para produção de pululana em meio baseado em glicose.....  | 64 |
| 5.3    | Produção de pululana a partir de meio baseado em glicose comercial empregando a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 42023.....   | 66 |
| 5.3.1  | Avaliação das condições de cultura empregando planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken.....   | 66 |
| 5.3.2  | Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de pululana em função das variáveis estudadas.....   | 68 |
| 5.3.3  | Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de biomassa em função das variáveis estudadas .....  | 71 |
| 5.3.4  | Otimização da produção de pululana por <i>A. pullulans</i> ATCC 42023.....  | 73 |
| 5.4    | Avaliação da produção de pululana, biomassa e melanina em processo fermentativo sob incidência de diferentes comprimentos de onda de luz e diferentes valores de densidade de fluxo de fótons | 78 |
| 5.5    | Análise comparativo global da produção de pululana, biomassa e melanina por <i>A. pullulans</i> ATCC 42023 na presença e ausência de luz.....   | 90 |
| 6      | CONCLUSÕES .....  | 92 |
| 7      | PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....  | 93 |
|        | REFERÊNCIAS .....   | 94 |

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a invenção dos plásticos, o seu consumo foi aumentando conforme foram ampliando-se os campos de aplicação, os quais são função das propriedades específicas de cada polímero e do custo de produção. O processo de obtenção de polímeros derivados do petróleo permitiu a produção, com baixo custo, de materiais sintéticos como elastômeros (borrachas sintética), termoplásticos e termofixos, os quais são amplamente utilizados na indústria de embalagem, de automóveis, farmacêutica, militar, entre outras (MULDER, 1998; RYBERG *et al.*, 2019; TANAKA *et al.*, 2019; UN ENVIRONMENT, 2018).

No entanto, o reuso e a reciclagem de polímeros sintéticos e tecnologias para sua destinação adequada têm avançado a um ritmo menor comparado com a crescente produção destes materiais (HUYSMAN *et al.*, 2017; KABIR *et al.*, 2020). Consequentemente, o acúmulo dos resíduos poliméricos dispostos no ambiente tornou-se fonte de poluição devido a sua pouca biodegradabilidade (BARNES, 2019; PROVENCHER *et al.*, 2020). Estima-se que, em 2015, 9,2 milhões de toneladas de plásticos foram descartadas no ambiente, sendo que 67% destes eram constituídos por macroplásticos (PVC, PP, LDPE, LLDPE, HGPE) e 33% por microplásticos (Elastômeros, PP, fibra de PET, fibra de PP) (RYBERG *et al.*, 2019).

Os problemas ambientais ocasionados pelo descarte inadequado incluem a interação do material sintético com a biota, resultando na liberação de componentes perigosos. Por exemplo, Lavers e Bond (2016) encontraram vestígios de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) nas penas de aves marinhas como *Laysan Albatross* e *Bonin Petrel*. Também, compostos químicos como o di-n-butil ftalato (DBP) (ZHAO *et al.*, 2015) e o di-(2-etil-hexil) ftalato (ZHU *et al.*, 2019) foram identificados em cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) e couve (*Brassica parachinensis* L.), respectivamente

Além disso, a natureza não renovável do petróleo, assim como a flutuação no seu preço, juntamente com as políticas de redução do consumo de plásticos, fizeram que a indústria dos polímeros buscasse uma mudança de paradigma (GEORGE *et al.*, 2020; HUYSMAN *et al.*, 2017; OHTOMO; OHNUMA, 2014; PROVENCHER *et al.*, 2020). Neste sentido, a procura de novos materiais que apresentem características similares aos polímeros sintéticos, sejam biodegradáveis e economicamente viáveis, tem acarretado em descobertas e inovações em diversos campos da ciência e tecnologia, sendo importantes, neste contexto, os biopolímeros, ou seja, os polímeros obtidos a partir de sistemas biológicos (microbiano, animal e vegetal) (CHEN *et al.*, 2020). Estes, além de possuírem potencial para substituir polímeros obtidos a partir do petróleo, apresentam propriedades que possibilitam aplicações exclusivas.

Particularmente, os biopolímeros obtidos de fontes microbianas, como os polissacarídeos, correspondem a uma alternativa atraente, sendo possível sua obtenção a partir de substratos orgânicos de fontes renováveis (GEORGE *et al.*, 2020), incluindo resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar (TERÁN-HILARES *et al.*, 2017, 2019), melão de beterraba e resíduo de amido (ISRILIDES *et al.*, 1994).

Entre os biopolímeros, destaque pode ser dado à pululana, um homopolissacarídeo extracelular sintetizado pelo fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (GIBBS; SEVIOUR, 1996; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018). Com características como não serem tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos (KIMOTO; SHIBUYA; SHIOBARA, 1997; TABASUM *et al.*, 2018), a pululana e seus derivados têm sido estudados em uma série de aplicações de interesse.

Sendo obtido em um processo biológico, a qualidade e quantidade da pululana produzida por *A. pullulans* dependem dos parâmetros de operação e da concentração e natureza dos nutrientes e substrato (HAMIDI *et al.*, 2019; SENA *et al.*, 2006). Por exemplo, estudos revelaram que a limitação de nitrogênio favorece o acúmulo de pululana, embora sua limitação excessiva possa desfavorecer a síntese de biomassa (HAMIDI *et al.*, 2019; ROUKAS; BILIADERIS, 1995).

No entanto, a produção concomitante do pigmento melanina com a pululana é uma característica indesejável das cepas selvagens de *A. pullulans* (HAWKES *et al.*, 2005; PRASONGSUK *et al.*, 2018; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Na indústria, este pigmento é removido por processos de *downstream* que resultam em aumento nos custos de produção (RAVELLA *et al.*, 2010). Com o propósito de reduzir ou inibir a produção deste pigmento, têm sido utilizadas cepas modificadas geneticamente (LI *et al.*, 2015) e estudos revelaram que a modificação genética, além de inibir a síntese de melanina, promove também um aumento na produção de pululana (CHEN *et al.*, 2017).

Como alternativa à modificação genética, Terán-Hilares *et al.* (2017) cultivaram uma cepa selvagem de *A. pullulans* em meio baseado em glicose comercial com incidência da luz LED azul (densidade de fluxo de fótons de 440  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), obtendo pululana (15,8 g/L) de cor branca e com baixos níveis de melanina (4,46 UA<sub>540nm</sub>/g de pululana). Estes autores, nas mesmas condições e mudando apenas a fonte de carbono para hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, reportaram 20 g/L de pululana com baixos níveis de melanina. Estes resultados motivaram a continuidade desta estratégia desenvolvida no Laboratório de

Biopolímero, Biorreatores e Simulação de processo (LBBSIM), do Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL – USP).

Assim, no presente trabalho, avaliou-se o efeito de diferentes condições de cultivo e condições de iluminação sobre a produção de pululana, biomassa e melanina por *A. pullulans*. Diferentes cepas desta espécie foram testadas, e planejamento estatístico foi empregado como ferramenta de análise de efeitos e otimização das condições de cultivo em frascos Erlenmeyer em meio baseado em glicose comercial. O uso deste substrato teve como objetivo fornecer base para estudos futuros de produção a partir de hidrolisado celulósico de resíduos e subprodutos agroindustriais. Nas condições selecionadas, experimentos foram conduzidos sob diferentes condições de iluminação, incluindo diferentes comprimentos de onda e densidades de fluxo de fótons de luz LED, avaliando-se o efeito na produção do biopolímero e do pigmento melanina.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros produzidos por processos biológicos que ocorrem em animais, plantas e micro-organismos (GEORGE *et al.*, 2020). Apresentam características semelhantes aos polímeros sintéticos, embora a biocompatibilidade e a sustentabilidade ambiental sejam qualidades destacadas nos biopolímeros (KUMAR; HOURELD; ABRAHAMSE, 2020; VINOD *et al.*, 2020).

Há um grande número de macromoléculas produzidas por seres vivos. Estruturalmente, estas podem estar na forma de cadeia linear ou ramificada, e suas unidades constituintes podem incluir ácidos nucleicos, aminoácidos, ácidos graxos, poliálcoois ou sacarídeos (ASHTER, 2016; IBRAHIM *et al.*, 2019). Baseados na estrutura de suas unidades constituintes, a Tabela 1 apresenta diferentes macromoléculas encontradas na natureza, muitas das quais se encaixam na definição de polímero, ou seja, são constituídos por unidades estruturais repetitivas.

**Tabela 1** – Macromoléculas encontradas naturalmente e suas funções.

| Polímero                       | Monômero              | Função   |
|--------------------------------|-----------------------|--|
| Ácido nucleico (DNA e RNA)     | Nucleotídeos          | Portadores de informação genética  |
| Proteína                       | $\alpha$ -aminoácidos | Catalisadores biológicos (enzimas), fatores de crescimento, receptores, materiais estruturais (lã, couro, seda, cabelo, tecido conjuntivo); hormonas (insulina); toxinas; anticorpos                               |
| Polissacarídeos (Carboidratos) | Açúcar                | Materiais estruturais em plantas e alguns organismos superiores (celulose, quitina); materiais de armazenamento de energia (amido, glicogênio); reconhecimento molecular (tipos sanguíneos), secreções bacterianas |
| Polihidroxialcanoatos          | Ácidos graxos         | Materiais de reserva de energia microbiana   |
| Polifenóis                     | Fenóis                | Materiais estruturais em plantas (Lignina), estrutura do solo (turfa), mecanismos de defesa de plantas (taninos)   |
| Polifosfatos                   | Fosfatos              | Materiais de armazenamento de energia inorgânica   |
| Polissulfeto                   | Sulfatos              | Materiais de armazenamento de energia inorgânica   |

**Fonte:** Adaptado de U.S.CONGRESS (1993).

De forma particular, os biopolímeros de origem microbiana são produzidos industrialmente por processos fermentativos (VERMA *et al.*, 2020). Alguns biopolímeros são armazenados dentro do micro-organismo, enquanto outros são acumulados extracelularmente, fornecendo proteção a condições adversas do ambiente (U.S.CONGRESS, 1993). Tanto micro-organismos selvagens quanto modificados geneticamente produzem uma ampla gama de biopolímeros, tais como ácido polilático

(PLA), Polihidroxialcanoatos (PHA), polissacarídeos e polímeros de ácido carboxílico e butanodiol (VERMA *et al.*, 2020).

Os polissacarídeos resultam da combinação de diversos monossacarídeos (Tabela 2) (U.S.CONGRESS, 1993; VINOD *et al.*, 2020). Entre os polissacarídeos de importância industrial estão a celulose, goma xantana, dextrina, alginato, quitina e pululana (RYDZ *et al.*, 2018; VERMA *et al.*, 2020).

**Tabela 2** – Exopolissacarídeos microbianos disponíveis no mercado.

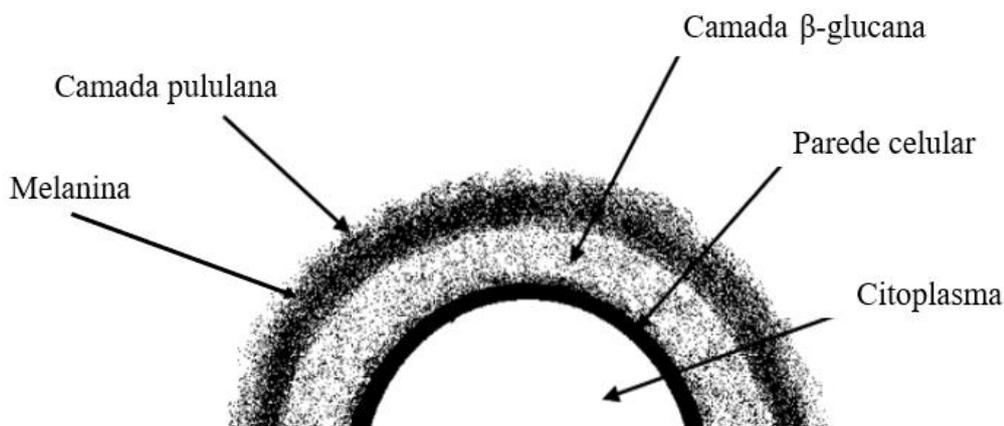
| Exopolissacarídeos | Origem   | Composição   |
|--------------------|--|--|
| Goma xantana       | <i>Xanthomonas campestris</i>  | Polissacarídeo estruturalmente composto de unidades repetidas de pentassacarídeo, contendo glicose, manose, ácido glucurônico e substituintes acetil e piruvato. |
| Dextrana           | <i>Leuconostoc mesentroides</i><br><i>Streptococcus mutans</i><br><i>Acetobacter sp.</i> | Polissacarídeo constituído por unidades de $\alpha$ -D-glicose unidos por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ .  |
| Goma curdlana      | <i>Alcaligenes faecalis</i>  | Polímero de D-glicose com ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ .   |
| Goma gelana        | <i>Pseudomonas elodea</i>  | Polímero parcialmente O-acetilado de glicose, ramnose e ácido glucurônico  |
| Escleroglucana     | <i>Sclerotium glutanicum</i>   | Unidades de glicose unidas principalmente por ligações $\beta(1\rightarrow3)$ com ligações glicosídicas ocasionais $\beta(1\rightarrow6)$                        |
| Pululana           | <i>Aureobasidium pullulans</i>   | Polissacarídeo composto por unidades de maltotriose linearmente polimerizadas e unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$                         |

Fonte: Adaptado de Singh e Saini, (2012).

## 2.2 Pululana e suas aplicações

A pululana é um exopolissacarídeo (EPS) produzido por *Aureobasidium pullulans*, *Tremella mesentérica*, *Cytaria harii*, *Cytaria darwinii*, *Cryphonectria parasítica*, *Teloschistes flavicans*, *Rhodototula bacarum* (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). No entanto, o fungo leveduriforme *A. pullulans* é a principal espécie utilizada industrialmente. Segundo os estudos morfológicos deste micro-organismo polimórfico, a biossíntese do EPS pululana ocorre quando o micro-organismo está na sua forma unicelular, principalmente como clamidósporo (CAMPBELL *et al.*, 2004; CATLEY, 1980; ROUKAS; BILIADERIS, 1995; SIMON; CAYE-VAUGIEN; BOUCHONNEAU, 1993), sendo produzido intracelularmente para posteriormente ser excretado na superfície celular, formando assim uma película viscosa ao redor das células (Figura 1) (SINGH; SAINI, 2012).

**Figura 1** – Distribuição das capas de pululana,  $\beta$ -glucana e melanina em *A. pullulans*.

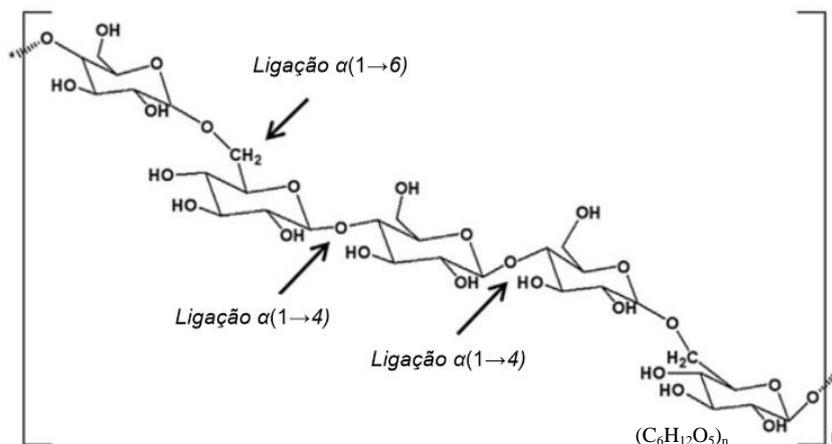


**Fonte:** Adaptado de Shingel, (2004)

Fisiologicamente, este EPS atua com uma reserva de carbono, mas também serve como barreira protetora contra as adversidades do meio (luz UV, metais pesados, poluentes orgânicos, baixa atividade de água e oxidantes) e constitui um componente estrutural da parede celular (CAMPBELL *et al.*, 2004; HAMIDI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2015; ROUKAS; BILIADERIS, 1995). A quantidade de pululana produzida varia significativamente de acordo com o estágio de crescimento celular e condições de cultura (CATLEY, 1971a; SIMON; CAYE-VAUGIEN; BOUCHONNEAU, 1993); além disso, a formação de pululana tem um comportamento inverso à formação de biomassa (CAMPBELL *et al.*, 2004).

Estruturalmente (Figura 2), a pululana é composta por unidades de maltotriose (um trímero de unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ ) linearmente polimerizadas e unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow6)$  (KATO *et al.*, 1982; LIU *et al.*, 2019; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018). Esta alternância de ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  e  $\alpha(1\rightarrow6)$  fornecem à pululana uma estrutura flexível e solúvel (KATO *et al.*, 1982; LI *et al.*, 2015). Este biopolímero é descrito na literatura como um hidrocolóide não iônico (LIU *et al.*, 2019), de estrutura amorfa e alta estabilidade térmica (HAMIDI *et al.*, 2019; KATO *et al.*, 1982), não mutagênico, não tóxico, não imunogênico, não cancerígeno, solúvel na água, resistente a óleo, transparente, insípido, inodoro, comestível, impermeável ao oxigênio, adequado para formação de filme, compatível com o ambiente e com o corpo humano (CHI *et al.*, 2009; CHOUDHURY; BHATTACHARYYA; PRASAD, 2012; LIU *et al.*, 2017; SIMON; CAYE-VAUGIEN; BOUCHONNEAU, 1993).

**Figura 2** – Estrutura química da pululana representadas por unidades de maltotriose unidas por ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ .



**Fonte:** Adaptado de Tabasum *et al.* (2018).

Estas propriedades tornam a pululana candidata potencial para uma ampla variedade de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e outras (SHINGEL, 2004), como por exemplo, na indústria de plásticos, podendo substituir materiais como policloreto de vinila e poliestireno em termos de transparência, dureza, resistência e brilho (XUE *et al.*, 2019). Sua natureza inodora, insípida e atóxica torna-a adequada para a indústria de alimentos e farmacêutica (HAN; LV, 2019). Por outro lado, as enzimas digestivas do ser humano não têm capacidade de degradar pululana e, por tanto, não aporta calorias na dieta e pode ser um substituto do amido nas formulações de alimentos e bebidas de baixa calorias (LIU *et al.*, 2017). Observou-se também sua potencialidade de uso como conservante, inibindo a retenção de umidade e o crescimento de fungos em alimentos armazenados, sua transparência e impermeabilidade a moléculas de óleo, graxa, água e oxigênio também permitem que a pululana seja usada em aplicações de embalagem de alimentos (TERÁN-HILARES *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2020). No entanto, seu potencial de uso é significativamente influenciado pela pureza do biopolímero, massa molar (Mw) e distribuição da Mw, os quais estão determinados pelas condições de processos de produção (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011c).

Observou-se que a pululana com alta Mw mostra uma alta viscosidade, aumentando deste modo o espectro de aplicabilidade comercial (PONNUSAMI; GUNASEKAR, 2015). Por exemplo, os produtos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e de materiais desenvolvidos com a pululana de alta Mw apresentaram maior resistência, durabilidade e estabilidade quando foram utilizados na produção de pellets, filmes impermeáveis ao

oxigênio, cápsulas de medicamentos e nanomateriais (LIU *et al.*, 2017; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008).

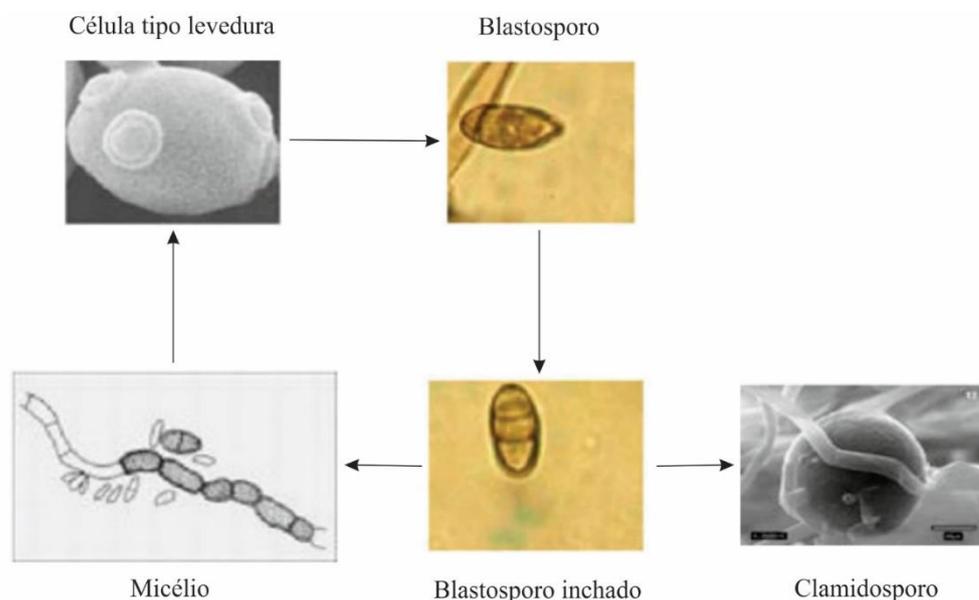
### **2.3 Variabilidade morfológica do *Aureobasidium pullulans*: formas celulares e influência das condições de cultivo**

*Aureobasidium spp* é um fungo saprofítico polimórfico (BERMEJO *et al.*, 1981b; CATLEY, 1980; RAMOS; GARCÍA, 1975) cujo comportamento e características são parecidos aos de leveduras (BROWN; HANIC; HSIAO, 1973); pertence ao filo Ascomycota, classe Euascomycetes e ordem Dothideales (LOTRAKUL *et al.*, 2009; OSIŃSKA-JAROSZUK *et al.*, 2015; POLLOCK; THORNE; ARMENTROUT, 1992). As colônias crescem rapidamente tornando-se viscosas devido à formação da biomassa (HAMIDI *et al.*, 2019; SINGH; SAINI, 2012; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). As colônias apresentam coloração rosada pálida, amarela ou marrom claro nos primeiros estágios de crescimento, provavelmente devido à formação dos blastosporos (LI *et al.*, 2015; RAMOS; GARCÍA, 1975), enquanto que a formação de clamidósporos e de hifas no último estágio ocasionam um escurecimento das colônias (HAMIDI *et al.*, 2019), sendo a produção de pigmentos escuros como a dihidroxinaftaleno-melanina (DHN-melanina) a responsável por este fenômeno (CHEN *et al.*, 2019b).

Estudos relacionados com a morfologia celular ressaltam a influência significativa dos níveis de pH e da concentração e natureza da fonte de nitrogênio e da fonte de carbono (BERMEJO *et al.*, 1981a, 1981b; BROWN; HANIC; HSIAO, 1973; CATLEY, 1971a, 1980; RAMOS; GARCÍA, 1975). Ramos e García (1975) identificaram 6 estágios de crescimento celular, sendo o primeiro correspondente à formação de blastosporos, que podem estar na forma esférica ou ovoide, de acordo com a fonte de nitrogênio (BERMEJO *et al.*, 1981a). No segundo estágio foi observada a presença de pseudomicélios (quando a célula filha e a célula mãe permanecem unidas), formando assim cadeias asseptadas de blastosporos (RAMOS; GARCÍA, 1975). Devido ao envelhecimento das pseudomicélios e a sua baixa viabilidade, acontece um processo de autólise (BERMEJO *et al.*, 1981a). Os blastosporos de maior tamanho são denominados de células “inchadas” e representam o terceiro estágio, o qual acontece quando uma baixa concentração celular (menos que  $1 \times 10^4$  células/150 ml) é colocada em um meio que contenha nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Neste caso, se o meio tiver um pH menor que 4,00, poderá ocasionar a morte celular ou geração de septos transversais (BERMEJO *et al.*, 1981a; RAMOS; GARCÍA, 1975). O quarto estágio caracteriza-se pela formação de micélios a partir de células inchadas septadas e, acontece

quando uma baixa concentração de biomassa é inoculada no meio, sendo que uma elevada concentração celular favorecerá a formação de blastosporos (RAMOS; GARCÍA, 1975). Em meios que contenham íons de amônio como fonte de nitrogênio, as células inchadas septadas mudam de aspecto, tornando-se escuras ao mesmo tempo que aumenta a espessura da parede celular, formando a célula chamada de clamidósporo, constituindo o quinto estágio do crescimento celular (BERMEJO *et al.*, 1981a; RAMOS; GARCÍA, 1975). Dependendo das condições do meio e da fonte de nitrogênio, estes clamidósporos podem gerar micélios, que por sua vez poderão formar blastosporos ou hifas (BERMEJO *et al.*, 1981b; RAMOS; GARCÍA, 1975), sendo que a formação de clamidósporos leva a uma queda do pH do meio (BERMEJO *et al.*, 1981a). No sexto estágio, o desenvolvimento micelial produz pigmentos escuro e um engrossamento da parede celular, podendo produzir biomassa celular na forma de clamidósporos (BERMEJO *et al.*, 1981b; BROWN; HANIC; HSIAO, 1973; CAMPBELL *et al.*, 2004). Na Figura 3 apresentam-se as principais formas morfológicas de *A. pullulans*.

**Figura 3** – Aspecto morfológico de *A. pullulans*



**Fonte:** Adaptado de Singh e Saini, (2012).

A capacidade de poder controlar as condições de processo, assim como a composição do meio, conduziu ao estudo da possibilidade de manter algumas formas morfológicas no *A. pullulans*. Com este intuito, Brown, Hanic e Hsiao (1973) observaram que, com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 40% da biomassa era constituída por formas filamentosas, enquanto

que, quando usado nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fonte de nitrogênio, 97% da massa celular estava na forma de células semelhantes a leveduras e clamidósporos. Um resultado similar foi observado por Campbell *et al.* (2004) que, quando utilizaram cepas de *A. pullulans* ATCC 9348 em um meio contendo  $\text{NaNO}_3$ , observaram predominância morfológica da forma unicelular. Já a formação de clamidósporos pode ser induzida por condições adversas, como foi demonstrado por Bermejo *et al.* (1981b) quando formularam um meio com alto conteúdo de açúcar, nitrogênio limitante e pH ácido. Simon, Caye-Vaugien e Bouchonneau (1993) observaram que na presença de 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no meio, o formato de hifas correspondeu a menos de 1% da biomassa total; um aumento na concentração deste composto (0,3% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), por outro lado, levou ao aumento no conteúdo de hifas.

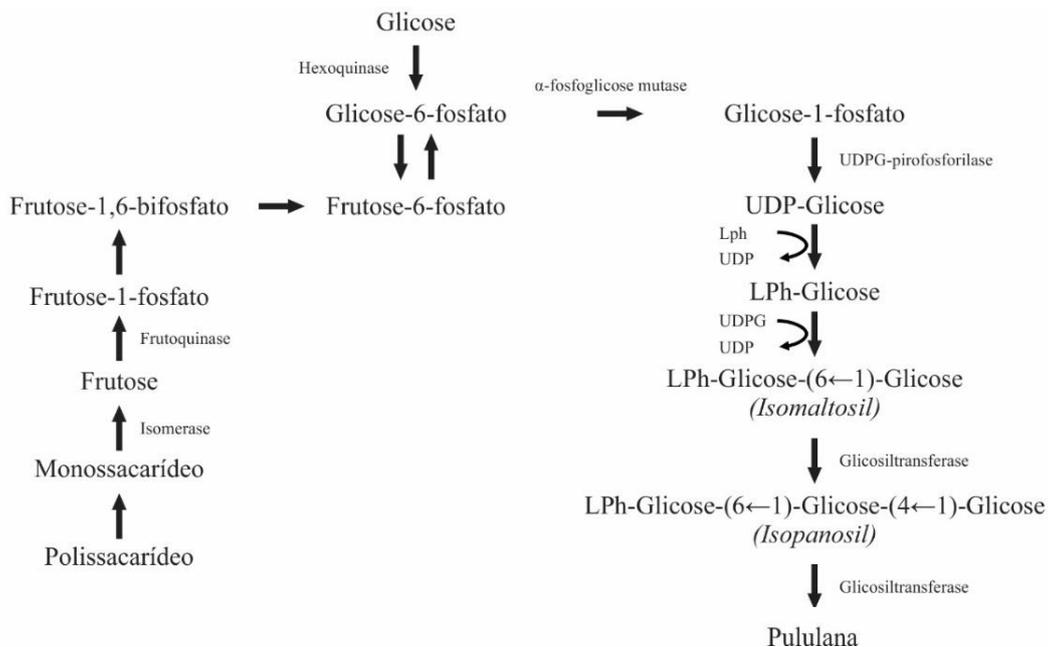
A capacidade polimórfica do *A. pullulans* facilitou sua adaptabilidade em diversos habitats (LI *et al.*, 2015), sendo possível encontrar cepas deste fungo na filosfera e filoplano das plantas (principalmente frutos) (GAUR *et al.*, 2010a; LORENZINI; ZAPPAROLI, 2019; SINGH; SAINI, 2008) em alguns casos como um endófito (RAMOS; GARCÍA, 1975), sendo encontrados também na superfície de banheiros (LOTRAKUL *et al.*, 2009), no mel natural (CHEN *et al.*, 2019b), na superfície cutânea (ZHANG *et al.*, 2011) e habitats desérticos (JIANG *et al.*, 2019). Na indústria, o polimorfismo torna-se um problema devido a sua extrema variabilidade, instabilidade genética e alta condição heterocariótica (LI *et al.*, 2015), resultado, com isso, em alterações no comportamento metabólico.

Como foi mencionado anteriormente, tanto a modificação morfológica quanto a variação do comportamento metabólico podem ser resultado de diversos fatores que atuam de forma sinérgica sobre este fungo, tais como a composição química e as impurezas do meio (inibidores e promotores), sistema de fermentação e condições ambientais empregados durante o processo fermentativo (ROUKAS; BILIADERIS, 1995; TERÁN-HILARES *et al.*, 2017, 2019), que resultam na biossínteses de diversos subprodutos de importância econômica variada, tais como enzimas ( $\alpha$ -amilase, glucoamilase, isopululanase, xilanase, pectinase,  $\beta$ -glucosidase, lacase) (GAUR *et al.*, 2010a; LIU *et al.*, 2018), polímeros (ácido polimálico (PMA), pululana,  $\beta$ -1,3-glucana) (BULIGA; BRANT, 1987; CHI *et al.*, 2016; LIU; STEINBÜCHEL, 1996; TERÁN-HILARES *et al.*, 2017, 2019), liamocina (BISCHOFF *et al.*, 2018; PRICE *et al.*, 2017, 2013; SAUR *et al.*, 2019), oligossacarídeos (LIU *et al.*, 2017) e biossurfactantes (BRUMANO *et al.*, 2017).

## 2.4 Biossíntese da pululana por *A. pullulans*

A síntese da pululana começa na fase de crescimento logarítmico tardio, promovida pela ausência ou redução dos nutrientes no meio de cultura, sendo na fase de crescimento estacionário onde ocorre a maior produção do exopolissacarídeo (GNIEWOSZ; DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2008). Ainda não está claro por completo o mecanismo da biossíntese da pululana; no entanto, Duan *et al.* (2008) sugeriram uma possível via metabólica, identificando três enzimas-chave ( $\alpha$ -fosfoglicose mutase (EC 5.4.2.2), uridina difosfoglicose pirofosforilase – UDPG-pirofosforilase (EC 2.7.7.9) e glicosiltransferase (EC 2.4.1.34) para transformar glicose em pululana; além da glicose, este fungo pode utilizar outras fontes de carbono, como sacarose, frutose, manose, maltose, galactose e xilose, podendo ser cultivado em meio contendo hidrolisado das frações carboidrato dos materiais lignocelulósicos (CATLEY, 1971b; CHEN *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2009a, 2016). Neste caso, as enzimas hexoquinase e isomerase são as responsáveis pela conversão destas fontes de carbono a UDP-Glicose, um importante precursor da biossíntese da pululana (CATLEY; MCDOWELL, 1982). Uma representação da possível via metabólica é mostrada na Figura 4.

**Figura 4** – Via metabólica para produção da pululana



**Fonte:** Adaptado de Tabasum *et al.* (2018), Sugumaran e Ponnusami (2017) e Cheng, Demirci e Catchmark (2011b).

Duan *et al.* (2008) ressaltam a importância da enzima  $\alpha$ -fosfoglicose mutase na formação de glicose-1-fosfato a partir de glicose-6-fosfato. O precursor da pululana UDP-glicose é formado a partir da glicose-1-fosfato pela enzima UDPG-pirofosforilase; em seguida, através de uma ponte fosfo-diéster, um resíduo de D-glicose proveniente da UDP-glicose é ligado à molécula lipídica hidroperóxido lipídico (LPh). Uma transferência adicional do resíduo D-glucose do UPDG-glicose origina isomaltosil ligado ao lipídio. No passo seguinte, o isomaltosil participa na reação com glucose ligada ao lipídeo para produzir um resíduo isopanosil como precursor. No último passo, a cadeia de pululana é formada pela polimerização de resíduos de isopanosil utilizando a enzima glicosiltransferase.

## 2.5 Fatores que influenciam na produção da pululana

A biossíntese da pululana é resultado de uma combinação sinérgica entre as condições do bioprocessamento e a disponibilidade de nutrientes (CAMPBELL *et al.*, 2004; CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011a). Na sequência, são apresentadas informações relevantes sobre alguns dos fatores que influenciam na produção microbiana deste exopolissacarídeo.

### 2.5.1 Fonte de carbono

As características da pululana variam conforme a fonte de carbono empregada, condições de processo e cepa microbiana (CATLEY, 1971b). Diversos trabalhos relatam a preferência do micro-organismo para produção de pululana a partir de sacarose (CHENG *et al.*, 2010; SHENG; TONG; MA, 2016). Além disso, Catley (1971) reporta preferência pela glicose em relação à frutose quando estas estão presentes no meio de cultura.

Há, no entanto, outros trabalhos reportando o uso de fontes como açúcares presentes em hidrolisado amiláceo (GÖKSUNGUR; UZUNOĞULLARI; DAĞBAĞLI, 2011; HII *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2016) ou lignocelulósico (SUGUMARAN; JOTHI; PONNUSAMI, 2014; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017a; TERÁN-HILARES *et al.*, 2017). Por exemplo, Chen *et al.* (2014) utilizando uma cepa mutante de *A. pullulans* AY82 e tendo como fontes de carbono a xilose e hidrolisado hemicelulósico, reportam uma produção de pululana de 17,63 g/L e 12,62 g/L, respectivamente, em 168 horas de cultivo. Em outro trabalho, Terán-Hilares *et al.* (2017) empregaram *A. pullulans* LB83 (cepa selvagem de *A. pullulans*) e, utilizando a fração carboidrato do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram 20 g/L de pululana depois de 168h de fermentação (28 °C, 200 rpm) em frasco Erlenmeyer sob luz LED azul (450 – 470 nm). Também neste trabalho pode ser observada a influência do

comprimento de onda de luz sobre o consumo das pentoses (principalmente xilose) presentes no hidrolisado, sendo que um maior consumo da xilose foi observado sob luz branca (98,31%) em comparação à luz LED azul (75%). Em outro trabalho, utilizando um biorreator de coluna de bolhas (25 °C, 0,5 vvm de aeração, 1,88 g/L de extrato de levedura), Terán Hilares *et al.* (2019), utilizando a mesma cepa (*A. pullulans* LB83), reportaram a produção de 18,64 g/L de pululana em 96h de fermentação.

Conforme pode ser observado na Tabela 3, diversos meios de cultivo têm sido utilizados na produção de pululana, incluindo tanto meios semissintéticos quanto fontes complexas.

**Tabela 3** – Produção de pululana utilizando diferentes fontes de carbono.

| Cepa                      | Tipo de fermentação                              | Fuente de carbono                                       | Produção  | Referência                         |
|---------------------------|--|---|-----------|------------------------------------|
| <i>A. pullulans</i> LB83  | Batelada - Smf (Frasco Erlenmeyer)               | Hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar      | 20 g/L    | Terán-Hilares <i>et al.</i> (2017) |
| <i>A. pullulans</i> LB83  | Batelada - Smf (Biorreator de coluna de bolhas). | Hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar.     | 18,64 g/L | Terán-Hilares <i>et al.</i> (2019) |
| <i>A. pullulans</i> AY82  | Batelada - Smf (Biorreator de tanque agitado).   | Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. | 12,65 g/L | Chen <i>et al.</i> (2014)          |
| <i>A. pullulans</i> AP329 | Batelada - Smf (Biorreator de tanque agitado)    | Sacarose  | 39 g/L    | Xia, Wu e Pan (2011)               |
| <i>A. pullulans</i> AP329 | Batelada - Smf (Frasco Erlenmeyer)               | Hidrolisado de batata-doce                              | 29,43 g/L | Wu <i>et al.</i> (2009a)           |

Smf: fermentação submersa;

Ssf: fermentação em estado solido.

**Fonte:** Autoria própria.

### 2.5.2 Fonte de nitrogênio e relação C/N

Na produção de pululana, tem sido avaliada por diversas pesquisas a influência da fonte e quantidade de nitrogênio presentes no meio de cultura. O excesso de nitrogênio no meio de cultura contribui com a formação de biomassa, porém, resulta em uma diminuição da concentração de pululana (BULMER; CATLEY; KELLY, 1987; CATLEY, 1971a). Segundo Rothman e Cabib (1969), o excesso de nitrogênio poderia ativar a enzima fosfofrutoquinase, direcionando o fluxo de carbono para a via glicolítica.

Os resultados de Jiang, Wu e Kim (2011) sugerem que condições de limitação de nitrogênio (0,25 g/L de NaNO<sub>2</sub>) favorecem a produção da pululana (22,46 g/L), modificando a morfologia do fungo *A. pullulans* AP329 e aumentando a atividade da enzima UDPG-pirofosforilase (45,07 mU/mg<sub>proteína</sub>). Em outro trabalho, empregando uma elevada concentração de sulfato de amônio (7 g/L), Cheng *et al.* (2011) relataram que, após 120h de fermentação e atingindo a máxima concentração de pululana (17,7 g/L), *A. pullulans* ATCC 201253 começou a degradar este biopolímero até 168h de fermentação em resposta a uma carência de fonte de carbono externa.

Realmente, a relação C/N tem sido apontada como um fator importante a ser considerado na produção de exopolissacarídeos. Por exemplo, Kumar, Mody e Jha (2007) mencionaram que uma relação C/N elevada (10:1) maximiza a produção de exopolissacarídeos no processo de fermentação submersa. Assim também, Sugumaran e Ponnusami (2015), empregando *A. pullulans* MTCC 2670 em condições de fermentação em estado sólido e elevada relação C/N (25:1), obtiveram 39,42 mg<sub>pululana</sub>/g de substrato seco.

### 2.5.3 Temperatura

Dependendo da cepa de *A. pullulans*, a temperatura ótima da biossíntese do polissacarídeo pode variar. Jiang (2010), por exemplo, reportou máxima produção de pululana (32 g/L) quando a cultura de *A. pullulans* SK 1002 estava a 28 °C. Nesta mesma temperatura (28 °C), Yadav, Rahi e Soni (2014) obtiveram 45,24 g/L de pululana sintetizada pelo *A. pullulans* RYLF-10. Wu *et al.* (2016), no entanto, empregando *A. pullulans* CJ 001, reportaram uma produção máxima de pululana (36,17 g/L) quando a temperatura do processo era de 20 °C.

### 2.5.4 pH

O pH é um fator influente na morfologia do *A. pullulans*. Em pH baixo, este microorganismo estará na forma unicelular e, nesta forma, a produção de pululana é maior que na forma micelial (CATLEY, 1980).

Em um trabalho com *A. pullulans* ATCC 9348, Bulmer, Catley e Kelly (1987) reportaram maior produção da pululana em células cultivadas em pH 4,00 em comparação ao uso de pH 7,00. Em outro trabalho, usando reator com membranas, Cheng, Demirci e Catchmark (2010) reportaram uma produção de 32,9 g/L de pululana pelo *A. pullulans* ATCC 201253 em um cultivo em pH 5,00. Xia, Wu e Pan (2011), por sua vez, demonstraram a relação entre a temperatura e pH no desenvolvimento da cepa de *A. pullulans* AP 329,

observando um aumento na produção de biomassa quando o meio de cultura estava a 32 °C e pH 2,50; contrariamente, o aumento da biossíntese de pululana aconteceu a 26 °C e pH 5,50. Um resultado similar obtiveram Sugumaran e Ponnusami (2015) em fermentação em estado sólido. Estes autores determinaram o pH 5,50 como valor ótimo que permite ter a máxima produção de pululana (39,42 mg<sub>pululana</sub>/g de substrato seco), tendo bagaço de mandioca como substrato.

### 2.5.5 Aeração

Uma variável importante a ser considerada no processo de biossíntese da pululana é a aeração, sendo que, sob condições anaeróbicas, tanto a produção de biomassa quanto da pululana é nula (LEATHERS *et al.*, 1988). Segundo Roukas e Mantzouridou (2001), uma intensa aeração (até 2,0 vvm) no processo fermentativo leva a um aumento na biossíntese da pululana como resultado do acúmulo da biomassa. Não obstante, o excesso na aeração poderia modificar a massa molar da pululana (AUDET; LOUNES; THIBAUT, 1996), o que poderia ser explicado devido à mudança da atividade da enzima responsável por esta característica do biopolímero (LEATHERS *et al.*, 1988). Wecker e Onken (1991) relataram que a diminuição no oxigênio dissolvido e na taxa de cisalhamento resultaram em um aumento na produção da pululana, possivelmente devido à permanência do micro-organismo na forma de levedura.

Cheng, Demirci e Catchmark (2011a), em um processo conduzido em um reator semicontínuo, avaliaram diferentes condições de aeração em um cultivo de *A. pullulans* ATCC 201253. Os resultados da pesquisa indicaram um valor ótimo de 1,5 vvm para produção tanto de biomassa quanto de pululana.

## 2.6 Produção da pululana em diferentes configurações de processo fermentativo

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas em fermentação submersa (Smf) e fermentação em estado sólido (Ssf) (AN *et al.*, 2017; SUGUMARAN *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2009b; XIA *et al.*, 2017), com resultados variados para produção de pululana.

Além disso, o modo de operação do processo tem sido apontado como fator a ser considerado na produção do biopolímero. Processos em batelada têm sido empregados tanto em fermentação submersa quanto em estado sólido.

Xia, Wu e Pan (2011), por exemplo, avaliaram 2 níveis de pH controlado (1,50 – 5,50) e 2 níveis de temperatura (26 – 32 °C) na produção em batelada de pululana em fermentação submersa. Estes autores obtiveram máxima produção de pululana (39 g/L) com uma variação

do pH e da temperatura em diferentes estágios da fermentação, pH baixo (2,50) e temperatura elevada (32 °C) nas primeiras 12 horas favoreceram a formação da biomassa e, após este tempo e até o término do processo (60 horas), o pH foi elevado (5,50) e a temperatura reduzida (26 °C) para favorecer a produção da pululana.

Ainda em processo em batelada com fermentação submersa, Lazaridou *et al.* (2002) trabalhando com variação nas condições de agitação (300, 500 e 700 rpm) e concentração de melão de beterraba (50 e 100 g/L), obtiveram máxima produção de pululana (49 g/L) quando o reator operou a 700 rpm, mantendo baixos os níveis de saturação de O<sub>2</sub> (~7%) e uma concentração de açúcar inicial de 100 g/L. Com relação à influência da aeração, cabe comentar que, durante a fermentação, a viscosidade do meio de fermentação aumenta devido à biossíntese da pululana (fluido não Newtoniano) e isto eleva a demanda do oxigênio (LI *et al.*, 2016).

A elevada concentração de substrato, assim como limitação de nutrientes e outras condições de processo podem ocasionar estresse sobre o micro-organismo, diminuindo o rendimento na produção de pululana devido a efeitos de supressão sobre as enzimas chave ( $\alpha$ -fosfoglicose mutase, uridina difosfoglicose pirofosforilase – UDPG-pirofosforilase e glicositransferase) (DUAN *et al.*, 2008; JIANG; WU; KIM, 2011; PAN *et al.*, 2013).

Neste caso, para evitar este problema, Shin *et al.* (1987) aplicaram uma estratégia de processo em batelada alimentada, com fornecimento intermitente de sacarose (10 g/L), obtendo 58 g/L de pululana em 168 h de processo. Do mesmo modo, Cheng *et al.* (2011) empregando processo em batelada alimentada com sacarose e utilizando *A. pullulans* ATCC 201253, reportaram 23,1 g/L de pululana com 94,6 % de pureza produzido em biorreator.

Há também relatos na literatura de processos operados em modo contínuo, sendo que a vazão específica de alimentação é um fator importante na produção de pululana em sistema quimiostato. Reeslev *et al.* (1997), usando *A. pullulans* QM 3092, recuperaram 3,6 g/L de pululana de um meio cuja fonte de carbono era glicose, em meio com pH 4,00 e com uma concentração limitante de zinco. Estes autores empregaram processo contínuo com uma vazão específica de alimentação de 0,08 h<sup>-1</sup>, em cultivo com temperatura constante (27 °C), aeração de 1,6 L.min<sup>-1</sup> e agitação de 1200 rpm. Em outro trabalho, Galiotou-Panayotou, Kalantzi e Aggelis (1998) realizaram experimento com *A. pullulans* ATHUM 2915 em biorreator com membrana, em processo contínuo, sendo que os parâmetros de processo foram: agitação 500 rpm, taxa de aeração 1 vvm e temperatura de 25 °C. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que a máxima eficiência (82%) na produção de pululana foi alcançada em pH 5,00. Orr *et al.* (2009), por sua vez, empregaram processo

contínuo e avaliaram a concentração de nitrogênio no cultivo de *A. pullulans* ATCC 9348 em um reator CSTR, observando uma mudança na morfologia do fungo (de unicelular para micélios) quando este foi cultivado em níveis elevados (0,78 g/L) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

A imobilização de células foi empregada como estratégia para produção de pululana (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011c; WEST; STROHFUS, 1998). No entanto, a produção do biopolímero tem sido menor quando comparada com outros métodos de fermentação devido a limitações difusionais. Entre os materiais mais utilizados na imobilização celular, destacam-se o uso do ágar e do alginato de cálcio os quais foram empregados em fermentação descontínua (WEST, 2000; WEST; STROHFUS, 2001).

Cheng, Demirci e Catchmark (2011b) imobilizaram o fungo na forma de um biofilme formado sobre o eixo do agitador de um biorreator, tendo reportado máxima concentração de pululana (8,3 g/L) e produtividade (1,3 g/(L.h)) quando o meio continha 15 g/L de sacarose, 0,9 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,4 de extrato de levedura, com uma vazão específica de alimentação de  $0,16 \text{ h}^{-1}$ .

## 2.7 Produção concomitante do pigmento melanina com a pululana

No meio ambiente, o fungo produz a melanina como um mecanismo de defesa contra a radiação UV, oxidação, tratamento térmicos, choque salino, dessecação e hidrólise ácida (JIANG *et al.*, 2017; POULIOT *et al.*, 2005). A melanina fúngica corresponde a compostos hidrofóbicos de elevada massa molar, com carga negativa, formados por polimerização oxidativa de compostos fenólicos tais como  $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB) ou catecol em *Basidiomycetes*, 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) em *Ascomycetes* e *Deuteromycetes*, ou 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (KOGJEJ *et al.*, 2004; POMBEIRO-SPONCHIADO *et al.*, 2017; VIDAL-CROS *et al.*, 1994; WHEELER; BELL, 1988; ZOU *et al.*, 2015).

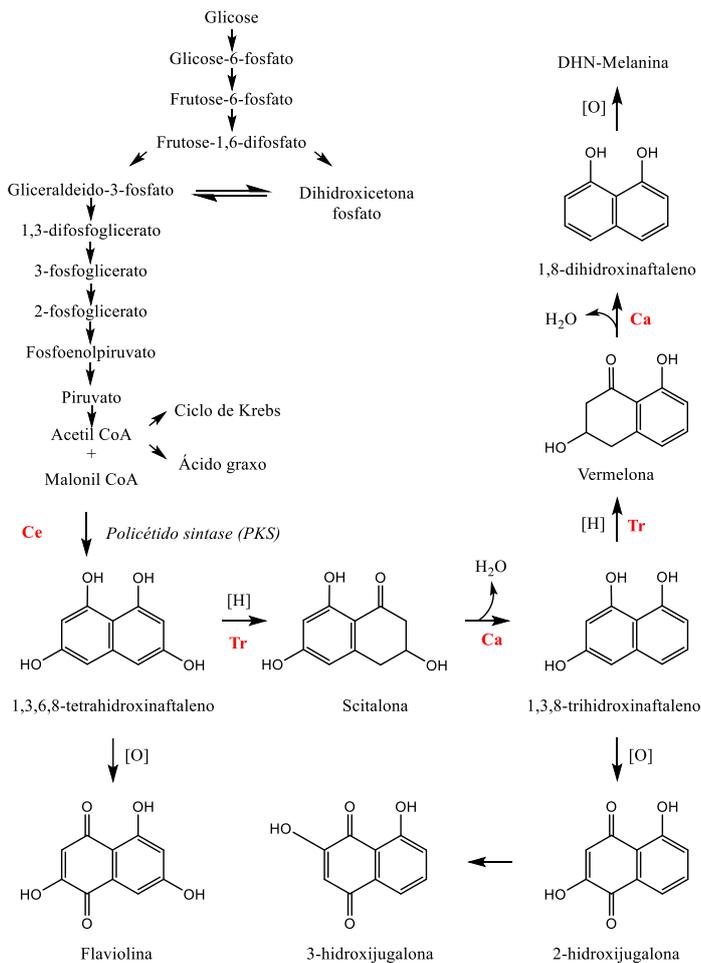
A produção de melanina, no entanto, representa um problema no setor industrial de produção de pululana, sendo preciso processos de *downstream* para remover este pigmento do biopolímero (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011c).

Com a finalidade de inibir a produção de melanina, diversos autores trabalharam com cepas modificadas geneticamente, mostrando resultados promissores na produção de pululana (CHEN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2015). Por outro lado, Terán-Hilares *et al.* (2017), aplicaram uma estratégia diferente; trabalhando com uma cepa selvagem (*A. pullulans* LB83) em um meio baseado em glicose, os autores avaliaram o comportamento do micro-organismo sob diferentes comprimentos de onda de luz LED. Os resultados obtidos

mostraram que a luz LED azul promoveu a máxima produção de pululana (15,77 g/L) com baixo teor de melanina (4,46 UA<sub>540 nm</sub>/g de pululana), sendo que, sob luz branca, a cepa produziu 11,75 g/L de pululana com elevado conteúdo de melanina (45,70 UA<sub>540 nm</sub>/g de pululana).

Fungos Ascomycota como *A. pullulans* produzem o pigmento melanina por meio da via dihidroxi-naftaleno-melanina (DHN-melanina), também chamada de via policetídis sintase (Figura 5) (POMBEIRO-SPONCHIADO *et al.*, 2017), uma via metabólica que consome uma grande quantidade de carbono e energia (CHEN *et al.*, 2019b), e que tem como precursor o composto 1,8-dihidroxi-naftaleno e a enzima chave policetídeo sintase (PKS) (CHEN *et al.*, 2019b; FENG *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2017; ROUKAS; BILIADERIS, 1995).

**Figura 5** – Síntese do dihidroxi-naftaleno-melanina (DHN-melanina) em fungo, com sitio específico de inibição para cada enzima em cada estágio (letras cor vermelha), sendo Ce: cerulenina, Tr: triciclazol (compostos como clobentiazona, pyroquilon, ftaeto, álcool pentaclorobenzílico e cumarina podem substituir ao triciclazol) , Ca: carpropamida. [H] reação de redução, [O] reação de oxidação.



**Fonte:** Adaptado de Aamir *et al.* (2018); Butler e Day, (1998); Jiang *et al.* (2017); Lee *et al.* (2003); Pihet *et al.* (2009); Vidal-Cros *et al.* (1994).

A via DHN-melanina começa com acetil-CoA e malonil-CoA, que são convertidos em 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (THN) pela enzima PKS. A enzima THN redutase transforma então o THN em scitalona. No entanto, THN redutase é inibida com triciclazol, ocasionando oxidação do THN e gerando flaviolina que será acumulada no meio de cultura. Posteriormente, a scitolona é desidratada para formar 1,3,8-trihidroxinaftaleno, sendo que a atividade enzimática da desidratase é inibida com carpropamida. A redução do 1,3,8-trihidroxinaftaleno para vermelona é catalisada pela enzima redutase, que também é inibida na presença do triciclazol; nesse caso, no lugar da vermelona, é gerado e acumulado hidroxijuglona por processo de oxidação. A formação do 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) ocorre por desidratação da vermelona. Finalmente, diversas reações de dimerização e polimerização catalisadas pela enzima lacase dão origem à melanina a partir do DHN (AAMIR *et al.*, 2018; BUTLER; DAY, 1998; JIANG *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2003; PIHET *et al.*, 2009; VIDAL-CROS *et al.*, 1994)

## 2.8 Aplicação de diferentes condições de iluminação sobre o metabolismo microbiano

A luz é uma forma de radiação eletromagnética de comportamento singular, comportando-se como uma onda e como partícula (fóton), sendo que a cor da luz é definida pelo comprimento de onda ( $\lambda$ , medido em nanômetro). O conteúdo energético da luz é inversamente proporcional ao comprimento de onda, deste modo, a luz vermelha ( $\lambda= 625 - 740$  nm) tem menos energia que a luz violeta ( $\lambda= 380 - 440$  nm) (SLINEY, 2016; VASA, 2019).

Por outro lado, o comportamento metabólico de alguns micro-organismos é fortemente influenciado pela presença ou ausência da luz no ambiente. Por exemplo, observou-se que a produção das micotoxinas ocratoxina (A e B) e da citrina por *Penicillium* é significativamente regulada pela presença da luz (SAMSON, 2016).

Velmurugan *et al.* (2010) postularam a existência de fotorreceptores responsivos à presença e ausência da luz em fungos produtores de pigmento como *Monascus purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium purpurogenum* quando avaliaram a produção de biomassa e pigmento intra e extracelular sob luz azul ( $\lambda= 492 - 455$  nm), verde ( $\lambda= 577 - 492$  nm), amarelo ( $\lambda= 597 - 577$  nm), vermelha ( $\lambda= 780 - 622$  nm) e escuridão durante 7 dias.

Por outro lado, Bryan *et al.* (2011) avaliaram o efeito da luz visível, luz UV e radiação gama sob os níveis de ATP em células de *Cryptococcus neoformans*. Esses autores reportaram que as três formas de radiação reduziram os níveis de ATP nas células

melanizadas da levedura; enquanto células sem melanina sob luz visível aumentaram os níveis de ATP, a radiação gama não causou alterações e a exposição aos raios UV levou em uma redução do ATP.

Com relação ao micro-organismo *A. pullulans* e à produção de pululana, no entanto, a influência da luz sobre o metabolismo (especificamente sobre o local de reação e enzimas envolvidas) ainda foi pouco reportada. Estudos conduzidas por Terán-Hilares *et al.* (2017, 2019) em *A. pullulans* LB83 concluíram que a incidência de luz azul ( $\lambda = 450 - 470$  nm) promoveu a máxima produção de pululana (15,77 g/L) ao mesmo tempo que reduziu a sínteses de melanina ( $4,46 \pm 0,26$  UA<sub>540nm</sub>/g de pululana) e biomassa (6,5 g/L) em 96h de processo em meio baseado em glicose. Contrariamente, neste mesmo trabalho, sob a luz vermelha ( $\lambda = 620 - 630$  nm), o micro-organismo produziu a máxima quantidade de biomassa (9 g/L), porém diminuiu a produção de pululana (12,50 g/L) e aumentou o conteúdo de melanina (8,34 UA<sub>540nm</sub>/g de pululana).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as condições de cultivo de *Aureobasidium pullulans* em meio baseado em glicose e o efeito de diferentes condições de iluminação sobre a produção do exopolissacarídeo pululana e do pigmento melanina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

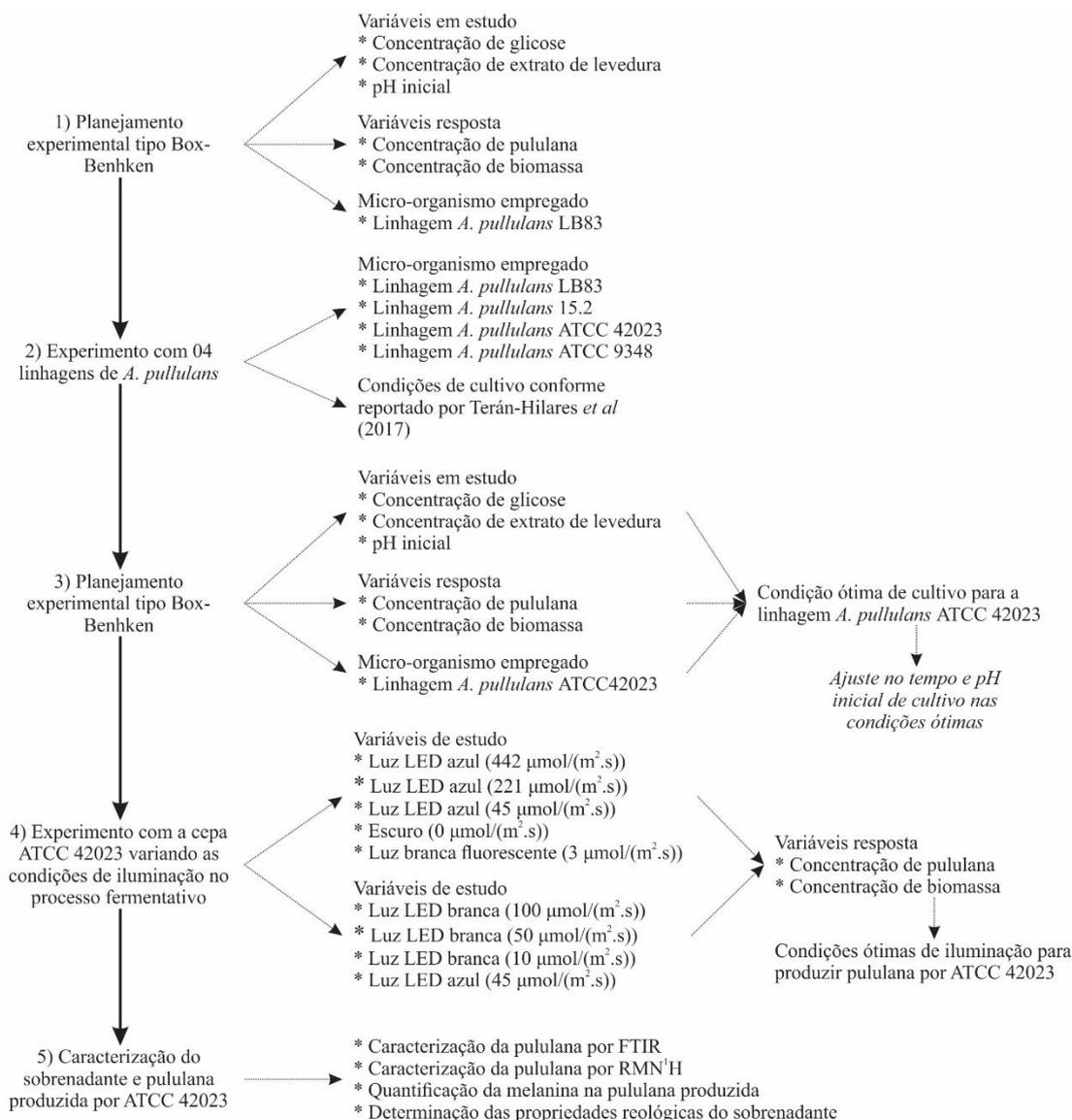
- Avaliar e otimizar o efeito das variáveis concentração de substrato, concentração de extrato de levedura e pH inicial na produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* em frascos Erlenmeyer utilizando meio baseado em glicose comercial;
- Avaliar o efeito do comprimento de onda de luz e da densidade de fluxo de fótons na produção de pululana e inibição do pigmento melanina em processos conduzidos em frascos Erlenmeyer utilizando meio baseado em glicose comercial;
- Caracterizar a pululana com relação a suas propriedades físico-químicas e reológicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção é descrita a metodologia empregada nesta pesquisa, a qual foi desenvolvida no Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM) e no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios), do Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL- USP).

Para melhor compreensão dos experimentos realizados, apresenta-se na Figura 6 a sequência de experimentos realizados neste trabalho.

**Figura 6** – Etapas realizadas no presente projeto para determinar as condições ótimas de concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial de cultura para produção de pululana por *A. pullulans*, assim como avaliação do efeito das condições de iluminação visado a maximizar a produção de pululana e reduzir a síntese de melanina.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

As cepas selvagens de *A. pullulans* LB83 e *A. pullulans* 15.2 foram gentilmente doadas pelo Centro de Estudo de Insetos Sociais (CIES/UNESP-Brasil). Estes micro-organismos foram isolados da formiga *Atta sexdens rubropilosa*, sendo coletados e identificados no estado de São Paulo (ARCURI *et al.*, 2014). As cepas de *A. pullulans* ATCC 42023 e *A. pullulans* ATCC 9348 foram adquiridas da Fundação André Tosello (N° de CCT: 4154 e 7521, respectivamente). Segundo a Fundação André Tosello, a cepa ATCC 42023 foi isolada de amostras de solo, enquanto que a cepa ATCC 9348 foi isolada de suprimentos militares deteriorados na Flórida, EUA.

Os micro-organismos foram estocados no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Brasil, conservando-se a 4 °C em meio YMA (ágar – extrato de malte – extrato de levedura) até seu uso.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultivo, o qual era composto por 35 g/L de glicose, 0,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L de NaCl e 0,1 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , sendo os frascos colocados em uma incubadora de movimento rotatório (Tecnal, TE-4200, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 28 °C e 200 rpm por 48h. Os componentes do meio utilizados procederam de soluções mãe concentradas, as quais foram previamente esterilizadas em separado, em autoclave, a 1 atm, 121 °C por 15 min.

Após 48h de crescimento, o caldo obtido foi centrifugado a 2860xg a 20 °C por 10 minutos (centrifuga HITACHI CF15RN Himac), sendo o sobrenadante depois removido e colocado em um tubo Falcon. Com a biomassa precipitada, preparou-se uma suspensão de células com água destilada estéril, sendo esta inoculada no meio de fermentação visando-se a atingir 1 g/L de concentração celular inicial.

#### 4.2 Preparo do meio e processo de fermentação para cultivo em condições de luz branca fluorescente, luz LED azul e luz LED branca

O meio de fermentação empregado continha a seguinte composição: 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L de NaCl e 0,1 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , além de glicose e extrato de levedura em concentrações variáveis conforme planejamento estatístico (seção 4.3). Para o preparo do meio, as soluções foram esterilizadas em autoclave de forma similar ao descrito na seção 4.1. Os valores de pH inicial foram variados de acordo com o planejamento de experimentos (seção 4.3), sendo ajustado com solução de NaOH (2,5 M e 0,5 M) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2,5 M e 0,5 M).

Frascos Erlenmeyer de 50 mL foram carregados com 20 mL de meio e colocados dentro da incubadora rotatória (Tecnal, TE-4200, Tecnal, São Paulo, Brasil) por períodos de 96, 120, 144 e 168h em condições de temperatura (28 °C) e agitação (200 rpm) constante com incidência de luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) ou condições de iluminação especificadas. A recuperação da pululana obtida, assim como a quantificação da biomassa foram feitas como descreve a seção 4.8

### 4.3 Avaliação das condições de cultivo empregando planejamento de experimentos tipo Box-Benhken

Neste projeto utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para avaliar a interação entre as variáveis de estudo e sua contribuição na produção de pululana e biomassa, assim como determinar o ponto ótimo de produção de pululana. Os três fatores avaliados foram: concentração de glicose ( $X_1$ ), concentração de extrato de levedura ( $X_2$ ) e pH inicial ( $X_3$ ), e as faixas de valores foram estabelecidas conforme Tabela 4. Um total de 15 ensaios experimentais foram realizados, conforme planejamento experimental de tipo Box-Behnken, sendo os dados obtidos analisados com auxílio do software Desing-Expert 12 (Stat-Ease, Inc., EUA).

Inicialmente, os experimentos foram realizados com a cepa LB83. Em seguida, após seleção da nova cepa (seção 4.4), realizou-se novo planejamento experimental para determinação das condições de concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

**Tabela 4** – Variáveis e níveis avaliados no planejamento estatístico realizado para determinar a influência dos fatores sobre a produção de pululana e biomassa por *A. pullulans*.

| Tipo de planejamento | Fatores                                   | Símbolo | Níveis |      |      |
|----------------------|---|---------|--------|------|------|
|                      |   |         | -1     | 0    | 1    |
| Box-Behnken          | Concentração inicial de glicose (g/L)     | $X_1$   | 70     | 105  | 140  |
|                      | Concentração de extrato de levedura (g/L) | $X_2$   | 1      | 3    | 5    |
|                      | pH inicial                                | $X_3$   | 6,00   | 7,00 | 8,00 |

Fonte: Autoria própria

### 4.4 Seleção de micro-organismo.

Para seleção da cepa, avaliaram-se o comportamento do processo com relação à produção de pululana e biomassa, assim como o pH final de três cepas selvagens de *A. pullulans* (*A. pullulans* 15.2, *A. pullulans* ATCC 42023 e *A. pullulans* ATCC 9348), as quais foram comparadas com a performance da cepa *A. pullulans* LB83. O preparo do inóculo

seguiu como indicado na seção 4.1. O processo de fermentação foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio contendo (TERÁN-HILARES *et al.*, 2017): 45 g/L de glicose, 0,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L de NaCl, 0,1 g/L de  $\text{MgSO}_4$ . Os frascos foram colocados em uma incubadora de movimento rotatório (Tecnal, TE-4200, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 28 °C e 200 rpm por 96h. A recuperação e quantificação da pululana e biomassa seguiu como indicado na seção 4.8.

#### **4.5 Ajuste no tempo de cultivo e pH inicial após otimização por planejamento experimental**

Com a cepa selecionada e considerando as condições ótimas obtidas no planejamento experimental (seção 4.3), procedeu-se a uma avaliação do efeito da variação no tempo de processo e no pH inicial, sendo a produção de pululana e biomassa avaliadas em 96, 120, 144 e 168h de processo em pH inicial de 4,00, 5,00, 5,50 e 6,00. O preparo de inóculo seguiu como indicado na seção 4.1, A recuperação e quantificação da pululana e biomassa seguiu como indicado na seção 4.8

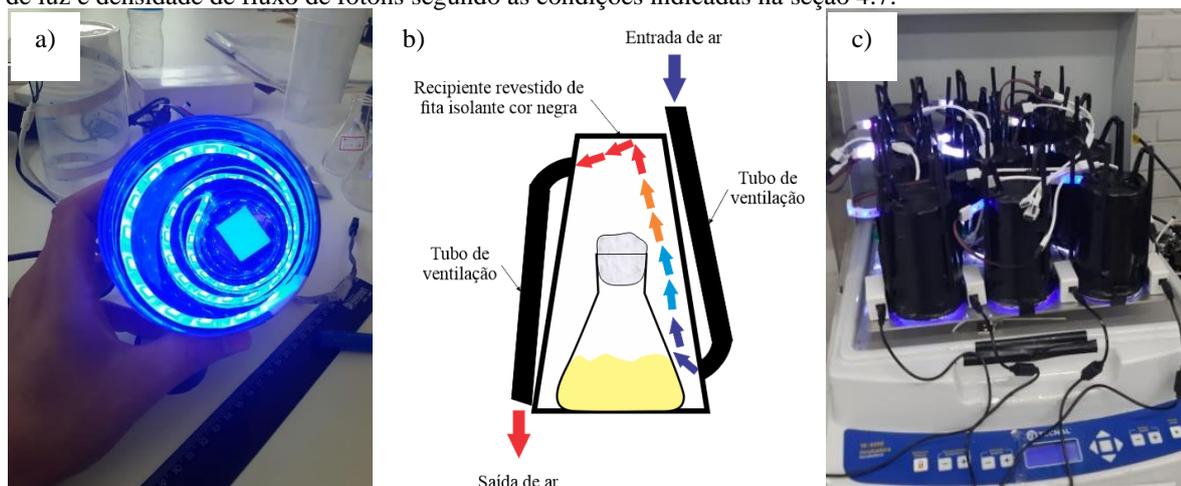
#### **4.6 Sistema empregado nos experimentos realizados sob diferentes condições de iluminação**

Depois de determinadas as condições ótimas de concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial, procedeu-se com a preparação do meio de fermentação (20 mL) em frascos Erlenmeyer de 50 mL nas condições otimizadas de processo. Estes frascos Erlenmeyer foram colocados dentro de recipientes (Figura 7), em cujo interior encontrava-se 71 cm de fita LED 5050 RGB (contendo 45 LED's distribuídos uniformemente) aderida na parede interna.

A superfície externa dos recipientes foi revestida com fita isolante com negra, visando ao isolamento dos frascos Erlenmeyer de fatores externos (como luz e densidade de fluxo de fótons diferentes dos planejados). Outra vantagem dos recipientes era a possibilidade de avaliar individualmente cada ensaio; assim, o comprimento de onda de luz bem como a densidade de fluxo de fótons seguiu como indicado na seção 4.7. Os recipientes com os frascos Erlenmeyer foram colocados na superfície da incubadora rotatória (Tecnal, TE-4200, Tecnal, São Paulo, Brasil), sendo fixada a temperatura (28 °C) e agitação (200 rpm). O tempo de processo variou em cada experimento (69, 120, 144 e 168h) e foi devidamente indicado quando os resultados foram apresentados. Para manter a temperatura constante dentro dos

recipientes, foram colocados quatro tubos de ventilação (dois de entrada e dois de saída de ar) que permitiram a transferência de ar entre o interior do sistema e o exterior. Estes tubos de ventilação foram revestidos com fita isolante cor negra e aderidos posteriormente na superfície externa dos recipientes seguindo o ângulo da superfície e de modo a permitir o fluxo de ar (Figura 7b).

**Figura 7** – Recipientes para os experimentos com fita LED: a) recipiente com fita LED 5050 RGB no interior, b) esquema do sistema de circulação de ar (fluxo de ar representado com setas em cores), c) distribuição dos recipientes com os frascos Erlenmeyer sobre a superfície da incubadora rotatória com o cumprimento de onda de luz e densidade de fluxo de fótons segundo as condições indicadas na seção 4.7.



Fonte: Autoria própria

#### 4.7 Avaliação dos efeitos das condições de iluminação sobre a produção de pululana, biomassa e melanina

Empregando-se as condições de cultivo selecionadas conforme seções 4.3 e 4.5, os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira, avaliou-se a incidência da luz LED azul (~450 nm) com densidade de fluxo de fótons de 442, 221 e 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , realizando-se também experimentos com os frascos mantidos no escuro (0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e sob luz branca fluorescente do laboratório (5000 K) com densidade de fluxo de fótons de 3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ . Na segunda etapa foi empregada luz LED branca (6500 K) com densidade de fluxo de fótons de 100, 50 e 10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  e luz LED azul (45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ).

Cada ensaio foi realizado em triplicata e avaliou-se a produção de pululana, biomassa e melanina.

#### 4.8 Recuperação da pululana e biomassa

Ao término de cada experimento, o caldo de fermentação foi colocado em tubo Falcon de 50 mL previamente tarado e centrifugado a 2860xg a 20 °C por 10 minutos (centrífuga

HITACHI CF15RN Himac). O sobrenadante foi colocado em outro tubo Falcon (50 mL) para posteriormente ser retirada alíquota de 5 mL de amostra. Esta alíquota foi adicionada a um Falcon (50 mL) vazio previamente tarado e agregou-se 10 mL de etanol, sendo que a mistura foi mantida em repouso a 4 °C por 12h; após este período, a mistura foi centrifugada a 2860xg a 20 °C por 10 minutos (centrífuga HITACHI CF15RN Himac), o sobrenadante foi descartado e a pululana recuperada dentro do tubo Falcon foi seca em estufa de recirculação de ar a 50 °C até massa constante. A concentração de pululana foi determinada por diferença de massa.

A concentração de biomassa determinou-se por medida de massa seca. Para isso, as células recuperadas no primeiro tubo Falcon mencionado acima foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente a 2860xg a 20 °C por 10 minutos (centrífuga HITACHI CF15RN Himac). Depois, o tubo foi colocado em uma estufa com ar recirculante a 50 °C até massa constante. A concentração de biomassa foi determinada por diferença de massa.

#### **4.9 Análise estatística**

Exceto com relação ao planejamento Box-Behnken, os resultados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) das amostras em triplicata. A análise estatística foi realizada por teste de Tukey com auxílio do software Statistica 13 (TIBCO software Inc., EUA).

#### **4.10 Cálculo da razão mássica C/N**

A razão mássica C/N determinou-se em função da porcentagem em massa de carbono na molécula de glicose e da porcentagem de nitrogênio total fornecida pelo fabricante do extrato de levedura, a qual era de 10% (informação obtida no rótulo do produto) (LABSYNTH Produtos para Laboratório Ltda, Brasil).

A massa total da glicose é 180 g/mol; assim, a massa total de carbono na molécula de glicose é de 72 g/mol. Por regra de três, determinou-se que 40% da massa total de uma solução de glicose esta constituída por carbono.

#### **4.11 Caracterização do sobrenadante e da pululana recuperada.**

##### **4.11.1 Determinação da concentração de glicose no sobrenadante**

A concentração de glicose no sobrenadante foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As amostras foram diluídas e posteriormente filtradas em membranas de 0,22  $\mu$ m (MF-Millipore <sup>TM</sup>, Merk, Alemanha). Em seguida, as amostras foram

injetadas em um cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent Technologies, Inc., EUA), sendo utilizadas as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

#### 4.11.2 Viscosidade aparente do sobrenadante

A viscosidade aparente ( $\mu_a$ ) das amostras de sobrenadante foi determinada empregando um viscosímetro rotacional Rheocalc T1.2.19 (Brookfield Engineering Labs Inc., EUA) com temperatura controlada ( $25 \pm 0,3$  °C). Antes de começar a medição, o *Spindle* (SC4-18) foi submerso no sobrenadante até atingir o equilíbrio térmico e as medidas foram registradas em intervalo de 30 segundos, aumentando a taxa de cisalhamento de 20 a 150 s<sup>-1</sup>.

Também foi determinado o comportamento reológico das amostras de sobrenadante usando a Lei da Potência de Ostwald-de Waele (Equação 1).

$$\tau = k\gamma^n \quad (1)$$

Em que

$\tau$  : Tensão de cisalhamento (Pa)

$\gamma$  : Taxa de cisalhamento (s<sup>-1</sup>)

$k$  : Índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>)

$n$  : índice de comportamento de fluido (sem dimensão).

Se  $n = 1$ , trata-se de um fluido newtoniano; se  $n < 1$ , trata-se de um fluido com comportamento pseudoplástico.

#### 4.11.3 Análise FTIR da pululana

A pululana recuperada foi caracterizada através de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) empregando instrumento Perkin Elmer Spectrum GX (Shelton, EUA), com resolução de número de ondas variável de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, conforme Wang *et al.*, (2014). As amostras de pululana foram preparadas em pastilhas usando 1,5 mg de pululana com 250 mg de brometo de potássio (KBr) em pó, sendo submetidas a secagem em dessecador a 50 °C sob pressão reduzida antes de serem analisadas. A pululana obtida nos experimentos foi comparada com pululana comercial grau farmacêutico (Dinaco, Rio de Janeiro, Brasil).

#### **4.11.4 Análise RNM<sup>1</sup>H da pululana**

A composição química da pululana recuperada foi avaliada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) em um espectrômetro Varian modelo Mercury 300 (LOQ-EEL-USP). Para as caracterizações, utilizou-se 10 mg de amostras solubilizada em 1 mL de DMSO-d<sub>6</sub>. A pululana obtida nos experimentos foi comparada com a pululana comercial grau farmacêutico (Dinaco, Rio de Janeiro, Brasil).

#### **4.11.5 Quantificação do pigmento melanina**

A quantidade de melanina presente na pululana foi determinada por Espectrofotometria, segundo West e Reed-Hamer (1993). Para isso, foi preparada uma solução aquosa de 12 g/L de pululana e a absorvância foi lida no espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer Kinetic, Alemanha) a 540 nm, utilizando água destilada como branco. A quantidade de melanina em cada amostra foi reportada como Unidade de Absorvância por grama de pululana (UA<sub>540nm</sub>/g de pululana).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de pululana a partir de meio baseado em glicose comercial empregando a levedura *Aureobasidium pullulans* LB83

#### 5.1.1 Avaliação das condições de cultivo empregando planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken

Procedeu-se a um planejamento experimental do tipo Box-Behnken para avaliação do efeito do pH inicial do meio e das concentrações de glicose e extrato de levedura na produção de pululana empregando a levedura selvagem *A. pullulans* LB83. Estes experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer expostos à luz branca fluorescente do laboratório (densidade de fluxo de fótons incidentes sobre os frascos:  $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). A Tabela 5 apresenta os valores obtidos no processo em 96h de fermentação.

**Tabela 5** – Matriz do planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central (valores codificados entre parêntesis) com variáveis independentes (concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial), razão mássica C/N e variáveis respostas de cada ensaio. Dados correspondentes a 96h de processo. Concentração de inóculo (g/L):  $1,16 \pm 0,01$ .

| Nº Ensaio | Fatores                       |      |   |      | Variáveis resposta |      |                                |                                |       |
|-----------|-------------------------------|------|---|------|--------------------|------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
|           | Concentração de glicose (g/L) |      | Concentração de extrato de levedura (g/L) |      | pH inicial         | C/N  | Concentração de pululana (g/L) | Concentração de biomassa (g/L) |       |
| 1         | 70,00                         | (-1) | 1,00                                      | (-1) | 7,00               | (0)  | 280                            | 17,28                          | 11,10 |
| 2         | 140,00                        | (+1) | 1,00                                      | (-1) | 7,00               | (0)  | 560                            | 16,52                          | 16,98 |
| 3         | 70,00                         | (-1) | 5,00                                      | (+1) | 7,00               | (0)  | 56                             | 33,60                          | 21,74 |
| 4         | 140,00                        | (+1) | 5,00                                      | (+1) | 7,00               | (0)  | 112                            | 23,40                          | 17,93 |
| 5         | 70,00                         | (-1) | 3,00                                      | (0)  | 6,00               | (-1) | 93                             | 34,72                          | 17,82 |
| 6         | 140,00                        | (+1) | 3,00                                      | (0)  | 6,00               | (-1) | 187                            | 35,44                          | 15,49 |
| 7         | 70,00                         | (-1) | 3,00                                      | (0)  | 8,00               | (+1) | 93                             | 14,08                          | 16,71 |
| 8         | 140,00                        | (+1) | 3,00                                      | (0)  | 8,00               | (+1) | 187                            | 20,58                          | 15,03 |
| 9         | 105,00                        | (0)  | 1,00                                      | (-1) | 6,00               | (-1) | 420                            | 26,40                          | 10,64 |
| 10        | 105,00                        | (0)  | 5,00                                      | (+1) | 6,00               | (-1) | 84                             | 42,10                          | 24,40 |
| 11        | 105,00                        | (0)  | 1,00                                      | (-1) | 8,00               | (+1) | 420                            | 18,12                          | 11,71 |
| 12        | 105,00                        | (0)  | 5,00                                      | (+1) | 8,00               | (+1) | 84                             | 24,30                          | 18,05 |
| 13        | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 39,08                          | 20,27 |
| 14        | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 32,26                          | 16,90 |
| 15        | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 35,52                          | 18,23 |

Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Tabela 5 que os máximos valores de concentração de pululana (42,10 g/L) e biomassa (24,40 g/L) foram obtidas nas condições do ensaio N° 10, no qual o pH inicial era 6,00 e a razão C/N de 84 (105 g/L de glicose e 5 g/L de extrato de levedura). Com o aumento na razão C/N de 84 para 420 no mesmo pH inicial (ensaio N° 9), produziram-se 26,40 g/L de pululana e 10,64 g/L de biomassa (menor concentração de biomassa registrada). Contudo, os ensaios N° 9 e N° 10 apresentaram aproximadamente a razão mássica produto:biomassa de 1:0,5. Uma razão mássica de 1:0,7 (produto:biomassa) foi observada nos ensaios N° 11 e N° 12, sugerindo que o aumento do pH inicial (de 6,00 para 8,00) pode

reduzir a produção de pululana em relação à biomassa, embora os ensaios tenham sido realizados em condições semelhantes de glicose e extrato de levedura em comparação aos ensaio N° 9 e N° 10, respectivamente.

Pode-se observar também a produção de 14,08 g/L de pululana (menor valor registrado no experimento) e 16,71 g/L de biomassa nas condições do ensaio N° 7 (relação produto:biomassa de 1:1,19), tendo sido utilizada uma razão C/N de 93 e pH inicial de 8,00. Com a razão mássica de C/N de 56 e pH inicial de 7,00 empregados no ensaio N° 3, produziram-se 33,60 g/L e 21,71 g/L de pululana e biomassa respectivamente, representando uma razão produto:biomassa de 1:0,65.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística e os efeitos das variáveis estudadas na produção de pululana e biomassa são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Efeito estimado, erro padrão (EP) e *p*-valor para as respostas concentração de pululana e de biomassa obtidos pela análise estatística dos resultados do planejamento experimental Box Behnken.

| Variável                                      | Concentração de pululana (g/L) |        |                   | Concentração de biomassa (g/L) |        |                   |
|---|--------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------|--------|-------------------|
|   | Efeito                         | EP     | <i>p</i>          | Efeito                         | EP     | <i>p</i>          |
| Média   | 25,55                          | ± 1,12 | 0,00 <sup>a</sup> | 16,47                          | ± 0,59 | 0,00 <sup>a</sup> |
| ( $X_1$ ) Concentração de Glicose             | -0,94                          | ± 2,75 | 0,75              | -0,49                          | ± 1,45 | 0,75              |
| ( $X_2$ ) Concentração de Extrato de levedura | 11,27                          | ± 2,75 | 0,01 <sup>a</sup> | 7,92                           | ± 1,45 | 0,00 <sup>a</sup> |
| ( $X_3$ ) pH inicial                          | -15,40                         | ± 2,75 | 0,00 <sup>a</sup> | -1,71                          | ± 1,45 | 0,29              |
| $X_1X_2$                                      | -4,72                          | ± 3,90 | 0,28              | -4,85                          | ± 2,06 | 0,07 <sup>b</sup> |
| $X_1X_3$                                      | 2,89                           | ± 3,90 | 0,49              | 0,33                           | ± 2,06 | 0,88              |
| $X_2X_3$                                      | -4,76                          | ± 3,90 | 0,28              | -3,71                          | ± 2,06 | 0,13              |
| $X_1^2$                                       | 7,22                           | ± 2,03 | 0,02 <sup>a</sup> | 0,73                           | ± 1,07 | 0,52              |
| $X_2^2$                                       | 5,70                           | ± 2,03 | 0,04 <sup>a</sup> | 0,80                           | ± 1,07 | 0,49              |
| $X_3^2$                                       | 2,19                           | ± 2,03 | 0,33              | 1,47                           | ± 1,07 | 0,23              |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança, <sup>b</sup> significativo a 90% de confiança.

**Fonte:** Autoria própria.

Conforme mostrado na Tabela 6, observa-se que a variável concentração de extrato de levedura apresentou efeito linear positivo significativo ( $p < 0,05$ ) tanto para concentração de pululana, quanto para produção de biomassa. Assim, o aumento da concentração do extrato de levedura (de 1 para 5 g/L) no meio de cultura representou um incremento médio de cerca de 11 g/L e 8 g/L na concentração de pululana e biomassa, respectivamente. De fato, o extrato de levedura é uma fonte de nitrogênio e outros micronutrientes que pode promover a formação de biomassa e, conseqüentemente, maior atividade de síntese do biopolímero (SINGH; KAUR, 2019). Efetivamente, maiores teores de pululana têm sido obtidas em culturas suplementadas com extrato de levedura em comparação ao uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (GÖKSUNGUR; UZUNOĞULLARI; DAĞBAĞLI, 2011; HAMIDI *et al.*, 2019). De fato, o uso de fontes de nitrogênio orgânico como o extrato de levedura e bagaço de soja tem

demonstrado melhorar a produção de pululana (SEO *et al.*, 2004; SINGH; KAUR; KENNEDY, 2019).

Por outro lado, a variável pH mostrou ter um efeito linear negativo significativo ( $p < 0,05$ ) para produção de pululana, com uma redução média de aproximadamente 15 g/L de pululana quando o valor do pH inicial aumentou de 6,00 para 8,00 no meio de cultura. Este tipo de comportamento foi observado na Tabela 5, na qual se pode notar que os ensaios N° 7, N° 8, N° 11 e N° 12 resultaram em menor conteúdo de pululana quando comparados com os ensaios N° 5, N° 6, N° 9 e N° 10, particularmente quando se comparam condições de processos semelhantes (concentração de glicose e de extrato de levedura) e variando apenas o valor de pH.

Conforme Tabela 6, os efeitos quadráticos das variáveis concentração de glicose e de extrato de levedura apresentaram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva sobre a produção de pululana, assim como, a interação entre as variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura resultou em um efeito negativo significativo ( $p < 0,10$ ) para produção de biomassa, sendo estes efeitos melhor compreendidos pelo traçado de superfícies de resposta, conforme discutido a seguir.

### 5.1.2 Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de pululana em função das variáveis estudadas

A Tabela 7 apresenta a análise de variância para um modelo quadrático de produção de pululana em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. Trata-se de modelo reduzido, do qual foram excluídas variáveis não significativas ( $p > 0,10$ ), exceto se necessárias para manutenção de hierarquia do modelo.

**Tabela 7** – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de pululana (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

| Fonte de variação                                  | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F      | p-valor             |
|--|-------------------|--------------------|------------------|--------|---------------------|
| Modelo   | 1008,87           | 5                  | 201,77           | 12,36  | 0,0008 <sup>a</sup> |
| (X <sub>1</sub> ) Concentração de Glicose          | 1,75              | 1                  | 1,75             | 0,1071 | 0,7510              |
| (X <sub>2</sub> ) Concentração Extrato de levedura | 254,03            | 1                  | 254,03           | 15,56  | 0,0034 <sup>a</sup> |
| (X <sub>3</sub> ) pH - inicial                     | 474,01            | 1                  | 474,01           | 29,03  | 0,0004 <sup>a</sup> |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>                        | 184,81            | 1                  | 184,81           | 11,32  | 0,0083 <sup>a</sup> |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>                        | 113,54            | 1                  | 113,54           | 6,95   | 0,0270 <sup>a</sup> |
| Resíduo  | 146,93            | 9                  | 16,33            |        |                     |
| Falta de ajuste                                    | 123,66            | 7                  | 17,67            | 1,52   | 0,4531              |
| Erro puro  | 23,27             | 2                  | 11,64            |        |                     |
| Erro Total   | 1155,80           | 14                 |                  |        |                     |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

Conforme mostrado na Tabela 7, o modelo ajustado foi significativo ( $p < 0,05$ ), sem falta de ajuste significativa ( $p > 0,10$ ). Seu valor de  $R^2$  foi de 0,87, com  $R^2_{\text{ajustado}}$  de 0,80. Assim, o modelo foi considerado adequado e é apresentado na Equação 2.

$$CP \text{ (g/L)} = 5,18 + 1,20X_1 + 11,11X_2 - 7,70X_3 - 0,006X_1^2 - 1,38X_2^2 \quad (2)$$

Em que:

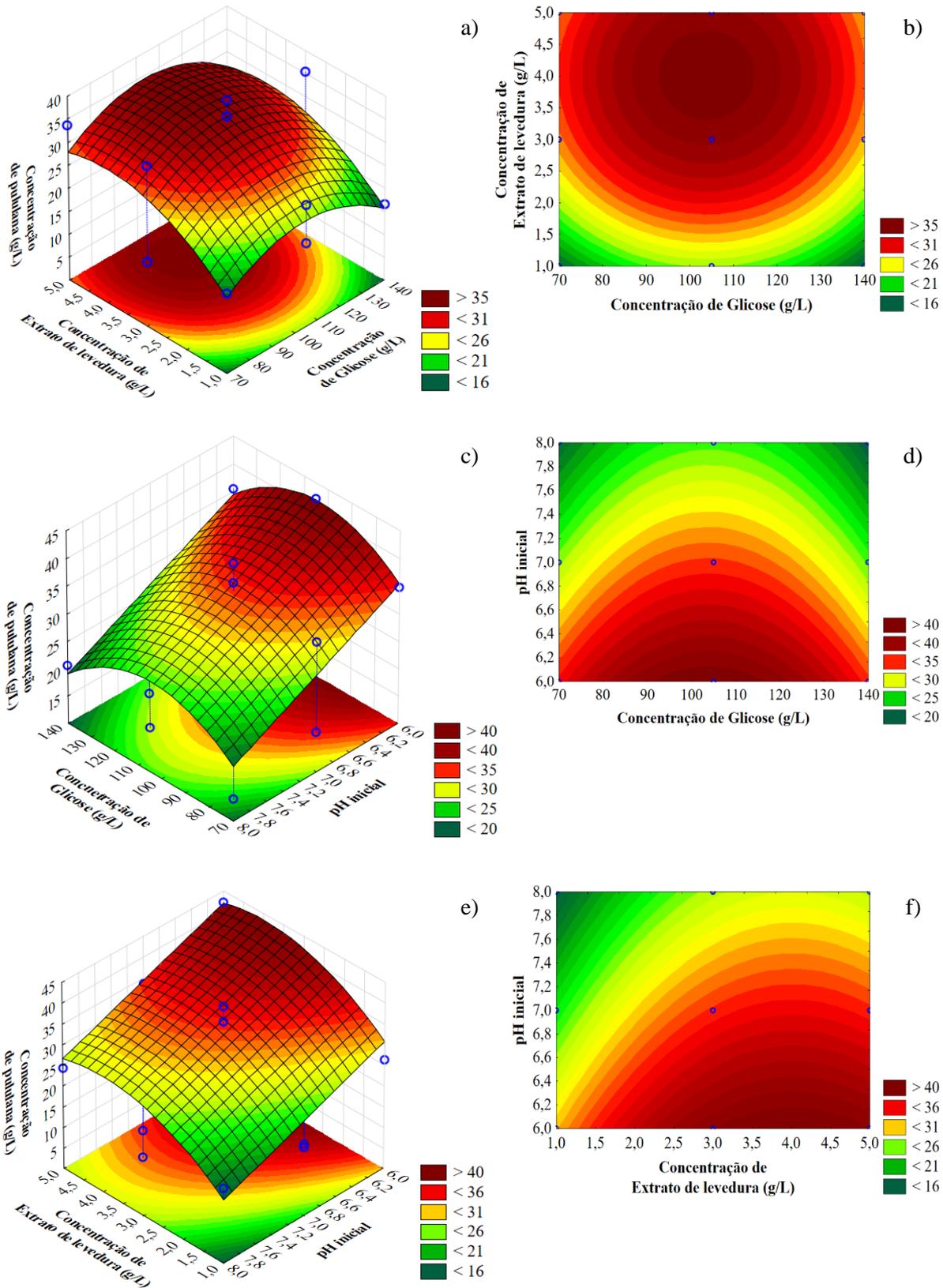
- CP : Concentração de pululana (g/L)  
 $X_1$  : Concentração de glicose (g/L)  
 $X_2$  : Concentração de extrato de levedura (g/L)  
 $X_3$  : pH inicial

Com a equação do modelo, foi possível traçar as superfícies de resposta da Figura 8, as quais possibilitam melhor visualização dos efeitos das variáveis estudadas.

Pode-se notar na Figura 8 que a produção de pululana foi máxima em concentrações intermediárias de glicose e extrato de levedura (Figura 8a,b), considerando-se a faixa de valores estudada. Este comportamento estaria relacionado com a razão mássica C/N, que, por sua vez, influi tanto na quantidade de biomassa e de pululana quanto na qualidade e características destes produtos (KUMAR; MODY; JHA, 2007; SHUKLA *et al.*, 2019; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b). Neste sentido, Campbell, Mcdougall e Seviour (2003), empregando a cepa *A. pullulans* ATCC 9348, reportaram 15 g/L de pululana em um meio cuja razão mássica C/N estava entre 184 e 92, enquanto que, quando foi utilizada uma razão C/N de 30, houve uma redução de 60% na produção de pululana. No entanto, naquele trabalho, uma elevada razão C/N (369) resultou uma redução de 60% na produção de pululana, isto causado pelo esgotamento da fonte de nitrogênio, produzindo assim uma baixa concentração de biomassa para síntese do biopolímero.

Na Figura 8a,b pode-se observar também que, quando mantida a concentração de glicose em 105 g/L (pH inicial 7,00), a quantidade de pululana estimada pelo modelo diminui tanto com o aumento da concentração de extrato de levedura ( $>4,5$  g/L) quanto pela redução deste componente ( $<3,5$  g/L). Por exemplo, a redução na concentração de extrato de levedura (de 5 para 1 g/L) causou uma queda aproximado de 37% na produção de pululana no ensaio N° 9 (26,40 g/L) quando comparado com o ensaio N° 10 (42,10 g/L) (Tabela 5).

**Figura 8** – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de pululana (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,d) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose de 105 g/L).



Fonte: Autoria própria

O comportamento observado, no entanto, depende da faixa de valores avaliada. Hamidi *et al.* (2019), por exemplo, relatam que o a produção de pululana decresce com o incremento da concentração de extrato de levedura.

Com relação à variável pH (Figura 8), valores menores que 7,00 favoreceram a produção de pululana (Figura 8c,d,e,f). De fato, as pesquisas relatam ser a produção de pululana favorecida entre a faixa de pH 5,00 e 6,50, devido a que o micro-organismo estaria na forma unicelular (HAGHIGHATPANAH *et al.*, 2020; SRIKANTH *et al.*, 2014; SUGUMARAN *et al.*, 2014; XIA; WU; PAN, 2011; YADAV; RAHI; SONI, 2014). Valores de pH menores que 4,50, por outro lado, promovem a formação de biomassa, reduzindo a produção do biopolímero (SHINGEL, 2004; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b). Também se observou produção de pululana nos ensaios cujo pH inicial era 8,00. Embora tenha sido pouco reportada na literatura a produção deste exopolissacarídeo nesse valor de pH, a presença de formas unicelulares junto com às formas filamentosas poderia ter possibilitado este resultado (CATLEY, 1971a; FINLAY, 1987; PRAJAPATI; JANI; KHANDA, 2013).

### 5.1.3 Análises de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de biomassa em função das variáveis estudadas

Um modelo empírico para a concentração de biomassa em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial do meio de cultura foi proposto, sendo feita a análise de variância para o modelo composto (Tabela 8). Para a composição deste modelo, do mesmo modo como foi efetuado para a variável resposta concentração de pululana, os coeficientes de baixa significância foram excluídos da equação, exceto se necessários para manutenção de hierarquia.

**Tabela 8** – ANOVA para um modelo reduzido com interação de dois fatores para produção de biomassa (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

| Fonte de variação                                  | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F      | p-valor             |
|--|-------------------|--------------------|------------------|--------|---------------------|
| Modelo   | 169,10            | 5                  | 33,82            | 9,46   | 0,0022 <sup>a</sup> |
| (X <sub>1</sub> ) Concentração de Glicose          | 0,4680            | 1                  | 0,4680           | 0,1309 | 0,7258              |
| (X <sub>2</sub> ) Concentração Extrato de levedura | 125,57            | 1                  | 125,57           | 35,13  | 0,0002 <sup>a</sup> |
| (X <sub>3</sub> ) pH - inicial                     | 5,85              | 1                  | 5,85             | 1,64   | 0,2329              |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>                      | 23,43             | 1                  | 23,43            | 6,55   | 0,0307 <sup>a</sup> |
| X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>                      | 13,78             | 1                  | 13,78            | 3,86   | 0,0812 <sup>b</sup> |
| Resíduo  | 32,17             | 9                  | 3,57             |        |                     |
| Falta de ajuste                                    | 26,39             | 7                  | 3,77             | 1,30   | 0,5000              |
| Erro puro  | 5,78              | 2                  | 2,89             |        |                     |
| Erro Total   | 201,27            | 14                 |                  |        |                     |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança, <sup>b</sup> significativo a 90% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

O modelo composto proposto foi significativo ( $p < 0,05$ ), com falta de ajuste não significativa ( $p > 0,10$ ). Seus valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$  foram 0,84 e 0,75, respectivamente. Assim, o modelo (Equação 3) foi considerado adequado para traçar as superfícies de respostas (Figura 9) que descrevem os efeitos das variáveis estudada.

$$CB \text{ (g/L)} = -12,75 + 0,10X_1 + 12,11X_2 + 1,93X_3 - 0,03X_1X_2 - 0,93X_2X_3 \quad (3)$$

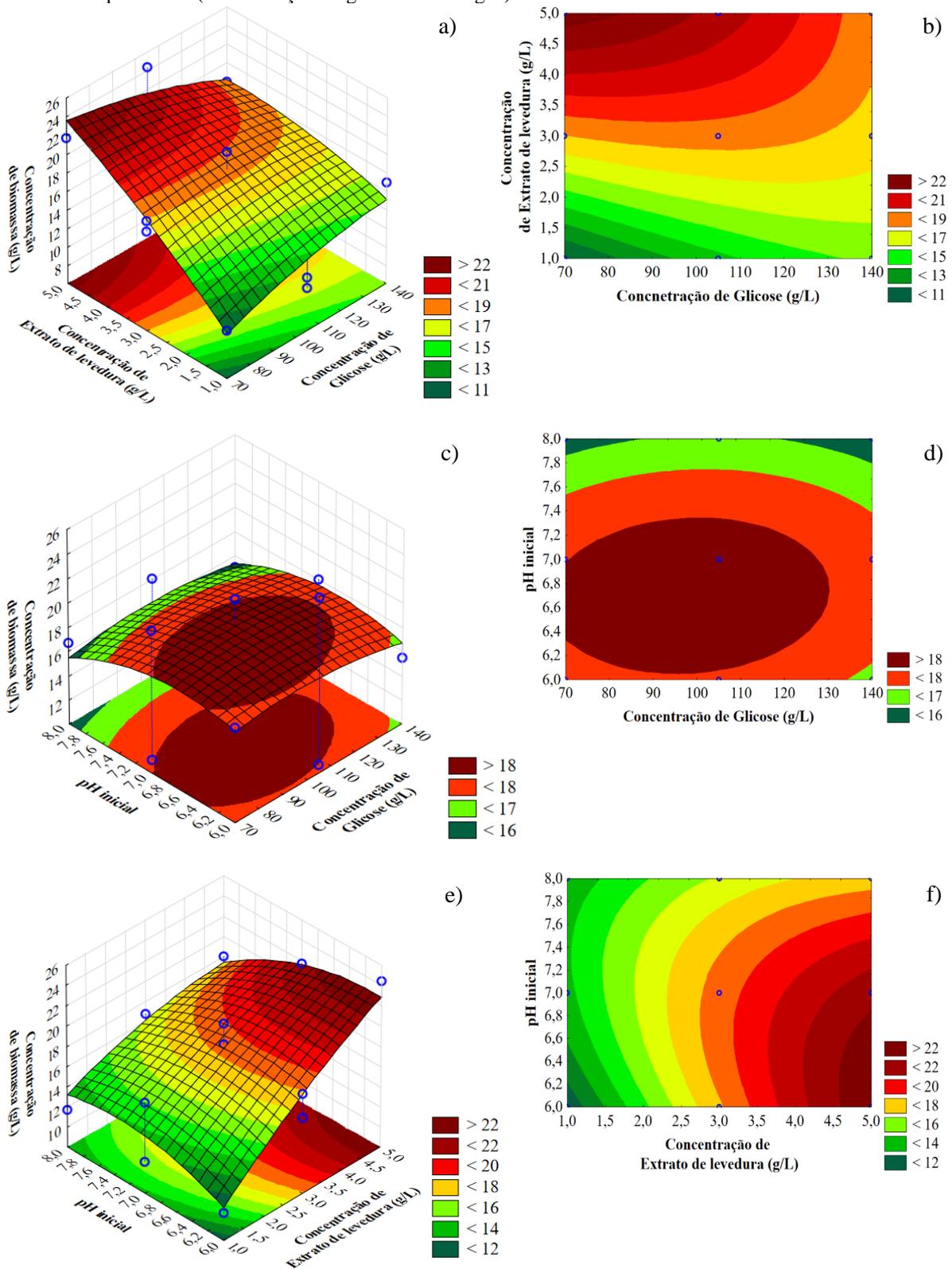
Onde

- CB : Concentração de biomassa (g/L)  
 $X_1$  : Concentração de glicose (g/L)  
 $X_2$  : Concentração de extrato de levedura (g/L)  
 $X_3$  : pH inicial

Conforme se observa na Figura 9a,b, um meio de cultura com baixas concentrações de glicose (<120 g/L) e alta concentração de extrato de levedura (>5 g/L) resultou em um aumento da concentração de células. Este resultado pode ser atribuído à razão mássica C/N, que, quando diminuída, direcionou o fluxo metabólico para formação dos blocos construtores da célula (CAMPBELL; MCDOUGALL; SEVIOUR, 2003). Este comportamento foi observado quando fixado o pH inicial em 6,00, e reduzida a razão C/N do ensaio N° 9 (C/N de 420) para o ensaio N° 10 (C/N de 84), o que resultou em um aumento de cerca de 130% na produção de biomassa (de 10,64 g/L para 24,40 g/L de biomassa) (Tabela 5). De forma similar, em pH 7,00 e reduzindo a razão C/N (de 560 no ensaio N° 2 para 56 no ensaio N° 3), incrementou-se em 28% a produção de células no ensaio N° 3 (21,74 g/L de biomassa) quando comparado com o ensaio N° 2 (16,98 g/L de biomassa). Observou-se também um aumento de cerca de 54% na produção de biomassa, quando a cepa LB83 cresceu em um meio com pH inicial de 8,00 e a razão C/N foi diminuída de 420 (ensaio N° 11) para 84 no ensaio N° 12. Contudo, houve condições nas quais a concentração de biomassa manteve-se quase constante, tanto com o aumento quanto com a redução da razão mássica C/N (de 93 para 187 e vice-versa), isto nos ensaios N° 5 e N° 6 (pH inicial de 6,00) e nos ensaios N° 7 e N° 8 (pH inicial de 8,00).

Como já fora reportado, a produção de biomassa dependera da razão C/N, enquanto que a forma morfológica será dependente de outros fatores como o pH, a temperatura componentes do meio de cultivo (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b).

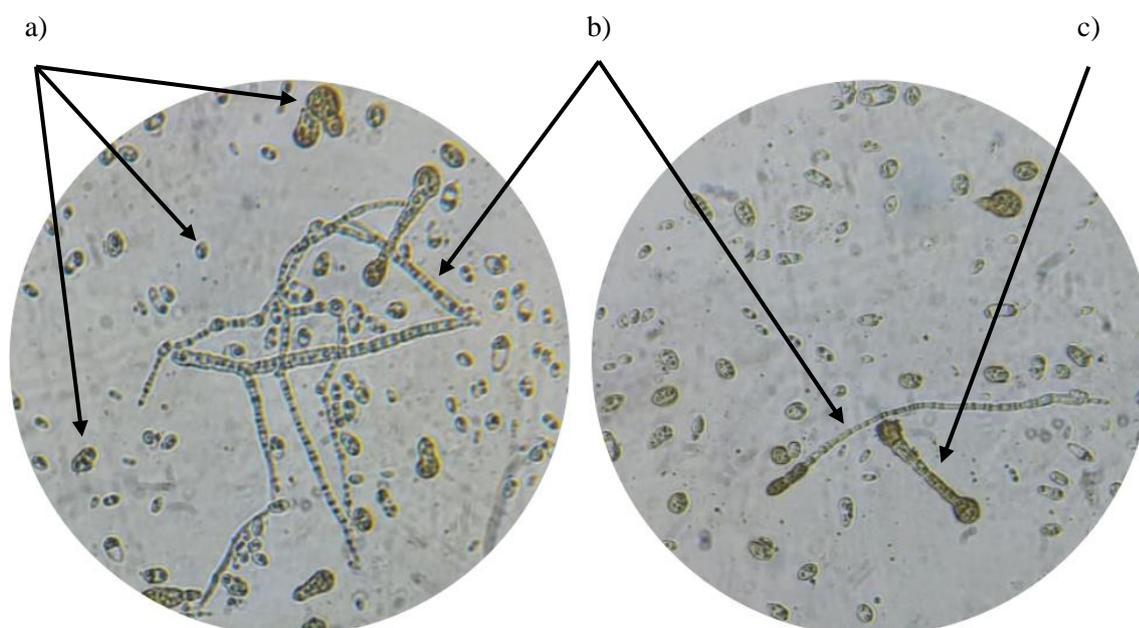
**Figura 9** – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de biomassa (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,d) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose de 105 g/L).



Fonte: Autoria própria.

Assim, a variável pH estaria influenciando a produção da biomassa e da pululana como consequência da variação morfológica do fungo *A. pullulans* (CATLEY, 1971a; PRAJAPATI; JANI; KHANDA, 2013). O comportamento, no entanto, varia muito com a linhagem microbiana. Por exemplo, a cepa *A. pullulans* AP 329 produziu a máxima concentração de biomassa em pH 2,50, enquanto que a máxima produção de pululana foi atingida em pH 5,50 (XIA; WU; PAN, 2011); em outro estudo, a produção do exopolissacarídeo, assim como da biomassa, por *A. pullulans* RYLF-10, foram atingidos em pH 5,00 (YADAV; RAHI; SONI, 2014). Diversas pesquisas apontam que, na faixa de pH entre 5,00 a 8,00, as estruturas morfológicas intermediárias se apresentam como células “inchadas”, blastosporos e pseudo-hifas que, dependendo da linhagem e das condições de cultura, poderiam estar em proporções diferentes, assim como algumas mostrariam capacidade de síntese de pululana (BERMEJO *et al.*, 1981b; CATLEY, 1980; RONEN; GUTERMAN; SHABTAI, 2002; XIA; WU; PAN, 2011). Na Figura 9c,d, mostra-se que a máxima produção de biomassa aconteceu entre a faixa de pH 6,20 e 7,20, quando mantida a concentração de glicose em 100 g/L, sugerindo que há presença de formas intermediárias com capacidade de síntese de pululana (Figura 8c,d,e,f). Na Figura 10 apresentam-se as estruturas morfológicas produzidas pelo *A. pullulans* LB83 em um meio de cultura com razão C/N de 190, pH inicial de 7,00 e 96h de processo.

**Figura 10** – Micrografias de *A. pullulans* LB83 cultivado em meio baseado em glicose comercial e extrato de levedura, com razão mássica C/N de 190 (95 g/L de glicose e 2 g/L de extrato de levedura), em pH inicial de 7,00 e 96h de processo. Destaca-se presença de: a) estruturas unicelulares (clamidósporo, blastosporo e célula “inchada”), b) pseudo-hifa e c) hifa. Microscópio óptico com fator de magnificação de 400x.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 5.1.4 Otimização da produção de pululana por *A. pullulans* LB83

Com a finalidade de maximizar a produção de pululana, procedeu-se com a otimização, tendo como base o modelo composto (seção 5.1.2). As condições ótimas foram determinadas empregando-se ferramenta específica de otimização numérica do programa Desing-Expert 12 (Stat-Ease, Inc., EUA), colocando-se como critério a maximização da concentração de pululana dentro da faixa de valores estudada para as variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

Nas condições otimizadas, os experimentos de validação do modelo foram realizados em triplicata. O ponto ótimo para cada variável independente, assim como os resultados previstos pelo modelo e os obtidos nos experimentos de validação são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Condições otimizadas de produção de pululana, resultados previstos pelos modelos empíricos para produção de pululana e biomassa e resultados obtidos em dois experimentos de validação realizados, cada um, em triplicata por 96h de processo e com razão C/N correspondente a 103,31.

| Condições ótimas              |   |            | Resultado previsto (média ± intervalo de confiança 95%) |                                | Resultado obtido (média ± desvio padrão)               |  |
|-------------------------------|---|------------|---|--------------------------------|--|--|
| Concentração de glicose (g/L) | Concentração de extrato de levedura (g/L) | pH inicial | Concentração de pululana (g/L)                          | Concentração de biomassa (g/L) | Concentração de pululana (g/L)                         | Concentração de biomassa (g/L)                         |
| 103,83                        | 4,02                                      | 6,0        | 43,41 ± 5,22  | 20,74 ± 2,30                   | 21,81 ± 1,05 <sup>a</sup><br>16,63 ± 0,75 <sup>b</sup> | 14,45 ± 0,86 <sup>a</sup><br>17,50 ± 0,81 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Primeiro experimento, <sup>b</sup> segundo experimento.

Fonte: Autoria própria.

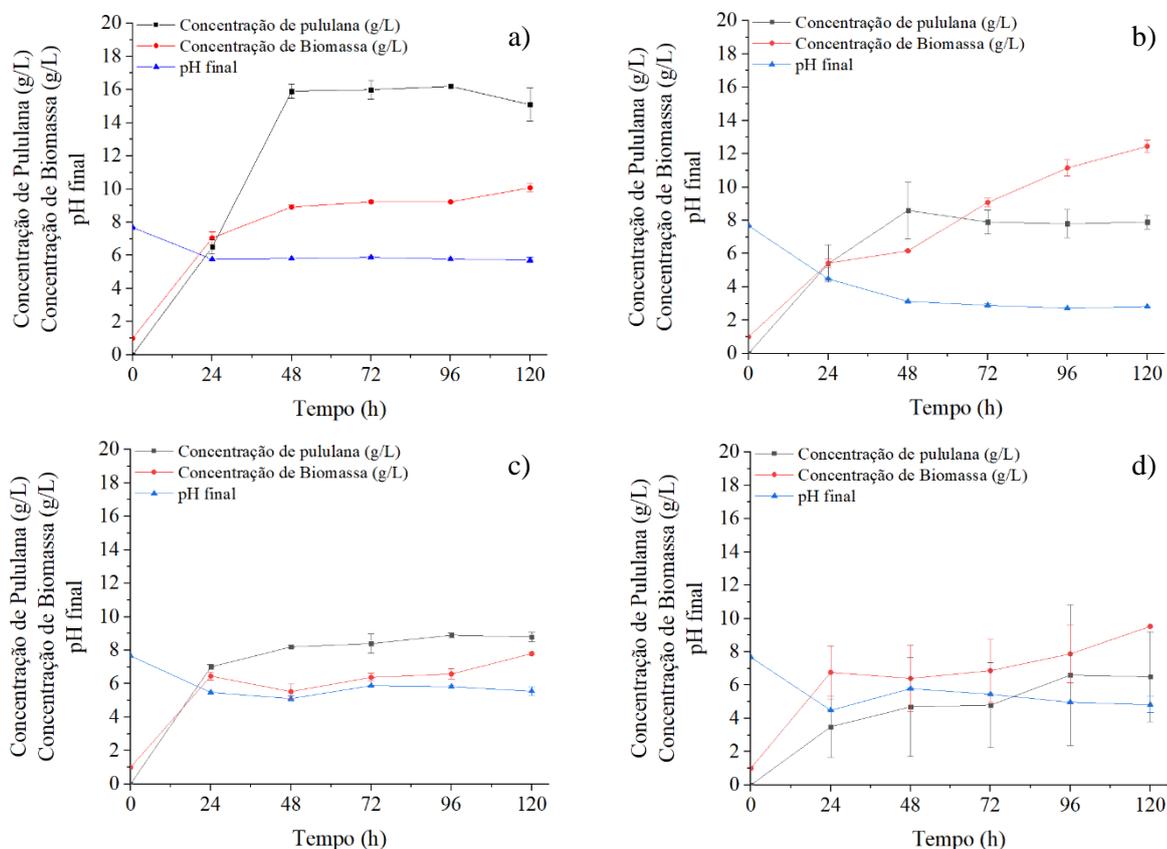
Durante o processo de validação do modelo, foram conduzidos dois experimentos em separado. Em ambos os casos, os valores médios das triplicatas (Tabela 9) mostraram um comportamento irregular quando comparados entre si e com resultados discrepantes do previsto pelo modelo. De fato, observou-se grande variabilidade nos resultados obtidos, com grande dificuldade em replicar resultados de experimentos empregando a linhagem *A. pullulans* LB83. Devido à falta de reprodutibilidade, não foi possível validar o modelo matemático. Efetivamente, diversas pesquisas indicam variação de resultados com cepas de *A. pullulans*, apontando como possível motivo da variação de suas características polimórficas e natureza instável, susceptível de variações ambientais, de processo ou de meio de cultura (LI *et al.*, 2015).

Em função da grande variabilidade experimental, foram avaliadas outras linhagens de *A. pullulans* para a produção de pululana, conforme discutido a seguir.

## 5.2 Avaliação de diferentes cepas de *A. pullulans* para produção de pululana em meio baseado em glicose

Em função da instabilidade observada nos resultados obtidos com a cepa *A. pullulans* LB83, dificultando a reprodutibilidade dos experimentos, foi realizada uma seleção de cepas alternativas com potencial para produção de pululana. Para isto, três cepas selvagem de *A. pullulans* foram selecionadas com base na literatura – *A. pullulans* ATCC 42023, *A. pullulans* ATCC 9348 (LIU *et al.*, 2017; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b), e *A. pullulans* 15.2. Foi avaliada a formação do biopolímero e a concentração de biomassa obtida, assim como o pH final do meio de cultivo, a cada 24h, até o termino do processo fermentativo (120h). As condições de cultivo foram as empregadas por Terán-Hilares *et al.* (2017), iniciando o processo com 45 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 0,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os resultados obtidos com estas cepas (*A. pullulans* ATCC 42023, *A. pullulans* ATCC 9348 e *A. pullulans* 15.2) foram comparados com a cepa LB83 nas mesmas condições de processo fermentativo, e são apresentados na Figura 11

**Figura 11** – Perfil cinético de formação de pululana, biomassa e pH final obtidos no cultivo com as cepas a) *A. pullulans* LB83, b) *A. pullulans* 15.2, c) *A. pullulans* ATCC 42023 e d) *A. pullulans* ATCC 9348. Concentração de inoculo: 1 g/L.



**Fonte:** Autoria própria.

Conforme mostrado na Figura 11, a maior concentração de pululana (~16 g/L) foi obtida em 48h com a cepa LB83 (Figura. 11a), mantendo-se este valor aproximadamente constante até o final do processo. As cepas de *A. pullulans* 15.2 e *A. pullulans* ATCC 42023 também atingiram máxima produção em 48h, sendo que o valor, de cerca de 8 – 9 g/L, permaneceu aproximadamente constante até o final do processo. A cepa ATCC 9348, por sua vez, resultou na máxima produção (6,6 g/L) em 96h.

Com relação à produção de biomassa, a cepa *A. pullulans* 15.2 resultou na maior concentração ( $12,45 \pm 0,35$  g/L) ao término das 120h de fermentação. Foi observado um declínio nos valores de pH final para todas as cepas testadas, de modo particular nas primeiras 24 – 48h de cultivo. A maior queda foi observada para *A. pullulans* 15.2, para o qual o valor de pH atingido foi de  $2,72 \pm 0,05$  em 96h de processo. A queda no valor de pH já foi reportada na literatura e está associada com dois fenômenos principalmente. O primeiro trata-se da produção de metabólitos de natureza ácida como o ácido polimálico (XIA *et al.*, 2017) e/ou a liamocina (um tipo de lipídeo polioliol) (PRICE *et al.*, 2013; SAUR *et al.*, 2019); o segundo fenômeno está relacionado ao consumo de compostos nitrogenados, promovendo a liberação de prótons que, quando acumulados no meio de cultura, terminam por o acidificar (BULMER; CATLEY; KELLY, 1987).

O comportamento da produção de pululana realmente varia bastante com o emprego de diferentes cepas de *A. pullulans* nas mais diversas condições. De fato, a quantidade e qualidade da pululana estará determinada pela linhagem assim como a suas características morfológicas, tolerância às condições de fermentação e configuração de processo (CHEN *et al.*, 2019b; SUGUMARAN *et al.*, 2013; TERÁN-HILARES *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2016). Com relação às condições e ao meio de cultivo, por exemplo, o uso do melaço de cana resultou em 47,84 g/L de pululana com *A. pullulans* ATCC 42023 (ABDEL HAFEZ *et al.*, 2007), enquanto que, em outro estudo com a mesma cepa, obteve-se 25,5 g/L de pululana com meio baseado em glicose comercial (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b). Em um estudo recente, Terán-Hilares *et al.* (2017) observaram o efeito positivo da utilização de luz LED azul na inibição da produção concomitante de melanina quando utilizando a cepa de *A. pullulans* LB83 e meio baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A cepa LB83 embora tenha apresentado uma melhor performance com relação às outras linhagens, não foi utilizada nesta pesquisa por causa da instabilidade mostrada (seção 5.1.4). Desta forma, considerou-se continuar os experimentos com a cepa *A. pullulans* ATCC 42023, por apresentar maior produção de biopolímero com relação à produção de biomassa, em 96h de processo.

### 5.3 Produção de pululana a partir de meio baseado em glicose comercial empregando a levedura *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023

#### 5.3.1 Avaliação das condições de cultura empregando planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken

Os ensaios de fermentação submersa com a levedura selvagem *A. pullulans* ATCC 42023 foram realizados de acordo com as seções 4.1 e 4.2, procedendo-se à avaliação dos efeitos do pH inicial do meio de cultura e das concentrações de glicose e extrato de levedura sobre a produção de pululana. A otimização da produção de pululana foi realizada empregando-se planejamento experimental tipo Box-Behnken, em conjunto com a metodologia de superfície de resposta. Os resultados obtidos no planejamento experimental são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** – Matriz do planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central (valores codificados entre parêntesis) com variáveis independentes (concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial), razão mássica C/N e variáveis resposta de cada ensaio. Dados correspondentes a 96h de processo. Concentração de inóculo (g/L):  $1,32 \pm 0,74$ .

| Nº<br>Ensaio | Fatores                       |      |   |      | Variáveis resposta |      |                                |                                |       |
|--------------|-------------------------------|------|---|------|--------------------|------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
|              | Concentração de glicose (g/L) |      | Concentração de extrato de levedura (g/L) |      | pH inicial         | C/N  | Concentração de pululana (g/L) | Concentração de biomassa (g/L) |       |
| 1            | 70,00                         | (-1) | 1,00                                      | (-1) | 7,00               | (0)  | 280                            | 15,14                          | 12,28 |
| 2            | 140,00                        | (+1) | 1,00                                      | (-1) | 7,00               | (0)  | 560                            | 15,70                          | 10,70 |
| 3            | 70,00                         | (-1) | 5,00                                      | (+1) | 7,00               | (0)  | 56                             | 12,20                          | 18,33 |
| 4            | 140,00                        | (+1) | 5,00                                      | (+1) | 7,00               | (0)  | 112                            | 14,78                          | 21,48 |
| 5            | 70,00                         | (-1) | 3,00                                      | (0)  | 6,00               | (-1) | 93                             | 20,64                          | 14,92 |
| 6            | 140,00                        | (+1) | 3,00                                      | (0)  | 6,00               | (-1) | 187                            | 37,70                          | 17,97 |
| 7            | 70,00                         | (-1) | 3,00                                      | (0)  | 8,00               | (+1) | 93                             | 12,68                          | 20,70 |
| 8            | 140,00                        | (+1) | 3,00                                      | (0)  | 8,00               | (+1) | 187                            | 12,02                          | 17,89 |
| 9            | 105,00                        | (0)  | 1,00                                      | (-1) | 6,00               | (-1) | 420                            | 33,76                          | 7,49  |
| 10           | 105,00                        | (0)  | 5,00                                      | (+1) | 6,00               | (-1) | 84                             | 24,14                          | 22,96 |
| 11           | 105,00                        | (0)  | 1,00                                      | (-1) | 8,00               | (+1) | 420                            | 13,12                          | 11,01 |
| 12           | 105,00                        | (0)  | 5,00                                      | (+1) | 8,00               | (+1) | 84                             | 9,50                           | 21,61 |
| 13           | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 27,54                          | 20,86 |
| 14           | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 27,48                          | 20,06 |
| 15           | 105,00                        | (0)  | 3,00                                      | (0)  | 7,00               | (0)  | 140                            | 24,22                          | 19,90 |

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados obtidos, a máxima produção de pululana (37,70 g/L) foi atingida nas condições do ensaio N° 6, com uma razão C/N de 187 e pH inicial de 6,00, resultando em razão mássica produto:biomassa de 1:0,48. Por outro lado, quando o valor de pH inicial foi elevado de 6,00 para 8,00 e mantida a razão C/N em 187 (condição semelhante à do ensaio N° 6), no ensaio N° 8 registrou-se um decréscimo de cerca 68% na produção de pululana, embora a produção de biomassa tenha sido similar (Tabela 10).

Quando o pH inicial foi mantido em 8,00 e a razão C/N reduzida para 84 (ensaio N° 12), foi obtida uma concentração de 9,5 g/L de pululana (menor valor obtido na série de experimentos) e 21,61 g/L de biomassa. A máxima produção de biomassa (22,96 g/L), por sua vez, foi registrada no ensaio N° 10, com pH inicial de 6,00 e uma relação C/N de 84; na mesma condição de pH (6,00) e elevando-se para 420 a razão C/N, observou-se uma redução em torno de 67,38% na formação de biomassa no ensaio N° 9 (7,49 g/L), quando comparada com a máxima produção.

Visando a identificar os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de pululana e biomassa, os resultados apresentados na Tabela 10 foram submetidas à análise estatística de significância de efeitos (Tabela 11).

**Tabela 11** – Efeito estimado, erro padrão (EP) e p-valor para as respostas concentração de pululana e de biomassa obtidos pela análise estatística dos resultados do planejamento experimental Box Behnken.

| Variável  | Concentração de pululana (g/L) |        |                   | Concentração de biomassa (g/L) |        |                   |
|---|--------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------|--------|-------------------|
|   | Efeito                         | EP     | p                 | Efeito                         | EP     | p                 |
| Média   | 18,45                          | ± 0,82 | 0,00 <sup>a</sup> | 16,44                          | ± 0,46 | 0,00 <sup>a</sup> |
| (X <sub>1</sub> ) Concentração de Glicose             | 4,89                           | ± 2,01 | 0,06 <sup>b</sup> | 0,45                           | ± 1,14 | 0,71              |
| (X <sub>2</sub> ) Concentração de Extrato de levedura | -4,28                          | ± 2,01 | 0,09 <sup>b</sup> | 10,72                          | ± 1,14 | 0,00 <sup>a</sup> |
| (X <sub>3</sub> ) pH inicial                          | -17,23                         | ± 2,01 | 0,00 <sup>a</sup> | 1,97                           | ± 1,14 | 0,14              |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>                         | 1,01                           | ± 2,85 | 0,74              | 2,36                           | ± 1,61 | 0,20              |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>                         | -8,86                          | ± 2,85 | 0,03 <sup>a</sup> | -2,93                          | ± 1,61 | 0,13              |
| X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>                         | 3,00                           | ± 2,85 | 0,34              | -2,44                          | ± 1,61 | 0,19              |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>                           | 5,66                           | ± 1,48 | 0,01 <sup>a</sup> | 1,24                           | ± 0,84 | 0,20              |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>                           | 6,29                           | ± 1,48 | 0,01 <sup>a</sup> | 3,34                           | ± 0,84 | 0,01 <sup>a</sup> |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>                           | -0,01                          | ± 1,48 | 0,99              | 1,17                           | ± 0,84 | 0,22              |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança, <sup>b</sup> significativo a 90% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

A variável pH inicial apresentou efeito linear negativo significativo ( $p < 0,05$ ) para produção de pululana (Tabela 11). Assim, a linhagem ATCC 42023 mostrou um decréscimo médio na produção de pululana de 17,23 g/L quando o nível de pH inicial foi elevado de 6,00 para 8,00, embora este incremento no pH tenha favorecido a produção de biomassa em aproximadamente 1,97 g/L.

De fato, os resultados experimentais apontam uma redução na produção de pululana atribuída ao incremento do pH inicial, sendo que a redução da capacidade de síntese de pululana ocorreu de forma proporcional ao aumento da concentração de biomassa (~38%) entre os ensaios N° 5 e N° 7 (Tabela 10).

Conforme apresentado na Tabela 11, quando houve um incremento na concentração de extrato de levedura de 1,00 g/L para 5,00 g/L, a produção de biomassa apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), com valor médio de 10,72 g/L. Porém, o incremento da

concentração da fonte de nitrogênio de 1,00 g/L para 5,00 g/L afetou significativamente ( $p < 0,10$ ) a produção de pululana, com redução média de 4,28 g/L.

A análise estatística da produção de pululana (Tabela 11) revelou ainda que a variável concentração de glicose apresentou efeito linear positivo significativo ( $p < 0,10$ ) para a concentração obtida deste biopolímero, resultando em um aumento médio de 4,28 g/L de pululana com o aumento de 70 para 140 g/L de concentração inicial de glicose no meio. Do mesmo modo, verificou-se a existência de uma relação inversa entre as variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura na produção de pululana, embora a interação destas variáveis não tenha sido significativa ( $p > 0,10$ ) para a concentração do biopolímero. No entanto, quando o pH inicial foi mantido em 7,00 e a concentração de glicose foi elevada de 70 para 140 g/L do ensaio N° 1 para o ensaio N° 2 (Tabela 10), o resultado foi um incremento de cerca de 3,76% no conteúdo de pululana (de 15,14 g/L para 15,70 g/L). Nas mesmas condições experimentais (pH 7,00 e concentração de glicose de 140 g/L) e alteração apenas do conteúdo de extrato de levedura (de 1 para 5 g/L), a quantidade de pululana produzida decresceu em cerca de 5,86% (de 15,70 para 14,78 g/L) no ensaio N° 4.

Conjuntamente, a interação entre a concentração de glicose e o pH inicial (Tabela 11) do meio apresentaram influência significativa ( $p < 0,05$ ) negativa para produção de pululana. Por sua vez, os efeitos quadráticos das variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura apresentaram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva sobre a produção de pululana, observando-se também um efeito quadrático positivo significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de extrato de levedura na produção de biomassa. Estes efeitos são melhor compreendidos quando traçadas as superfícies de resposta, conforme discussão a seguir.

### **5.3.2 Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de pululana em função das variáveis estudadas**

A análise de variância apresentada na Tabela 12, para um modelo quadrático de produção de pululana em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial, refere-se a um modelo reduzido, o qual incluiu apenas os termos lineares, quadráticos e de interação cujo  $p$ -valor foi significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12** – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de pululana (g/L) em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

| Fonte de variação                                  | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F     | p-valor              |
|--|-------------------|--------------------|------------------|-------|----------------------|
| Modelo   | 1005,26           | 6                  | 167,54           | 26,51 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| (X <sub>1</sub> ) Concentração de Glicose          | 47,73             | 1                  | 47,73            | 7,55  | 0,0251 <sup>a</sup>  |
| (X <sub>2</sub> ) Concentração Extrato de levedura | 36,55             | 1                  | 36,55            | 5,78  | 0,0428 <sup>a</sup>  |
| (X <sub>3</sub> ) pH - inicial                     | 593,75            | 1                  | 593,75           | 93,96 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>                      | 78,50             | 1                  | 78,50            | 12,42 | 0,0078 <sup>a</sup>  |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>                        | 119,20            | 1                  | 119,20           | 18,86 | 0,0025 <sup>a</sup>  |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>                        | 147,19            | 1                  | 147,19           | 23,29 | 0,0013 <sup>a</sup>  |
| Resíduo  | 50,55             | 8                  | 6,32             |       |                      |
| Falta de ajuste                                    | 43,33             | 6                  | 7,22             | 2,00  | 0,3701               |
| Erro puro  | 7,22              | 2                  | 3,61             |       |                      |
| Erro Total   | 1055,81           | 14                 |                  |       |                      |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança.

**Fonte:** Autoria própria.

De acordo com a ANOVA, o modelo obtido (Equação 4) foi significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12), apresentando alto valor de  $R^2$  (0,95) e  $R^2_{\text{ajustado}}$  (0,92), confirmando o ajuste do modelo proposto para os dados experimentais de forma adequada, sem falta de ajuste significativa ( $p > 0,10$ ).

$$CP \text{ (g/L)} = -75,58 + 1,93X_1 + 8,37X_2 + 4,68X_3 - 0,13X_1X_3 - 0,005X_1^2 - 1,57X_2^2 \quad (4)$$

CP : Concentração de pululana (g/L)

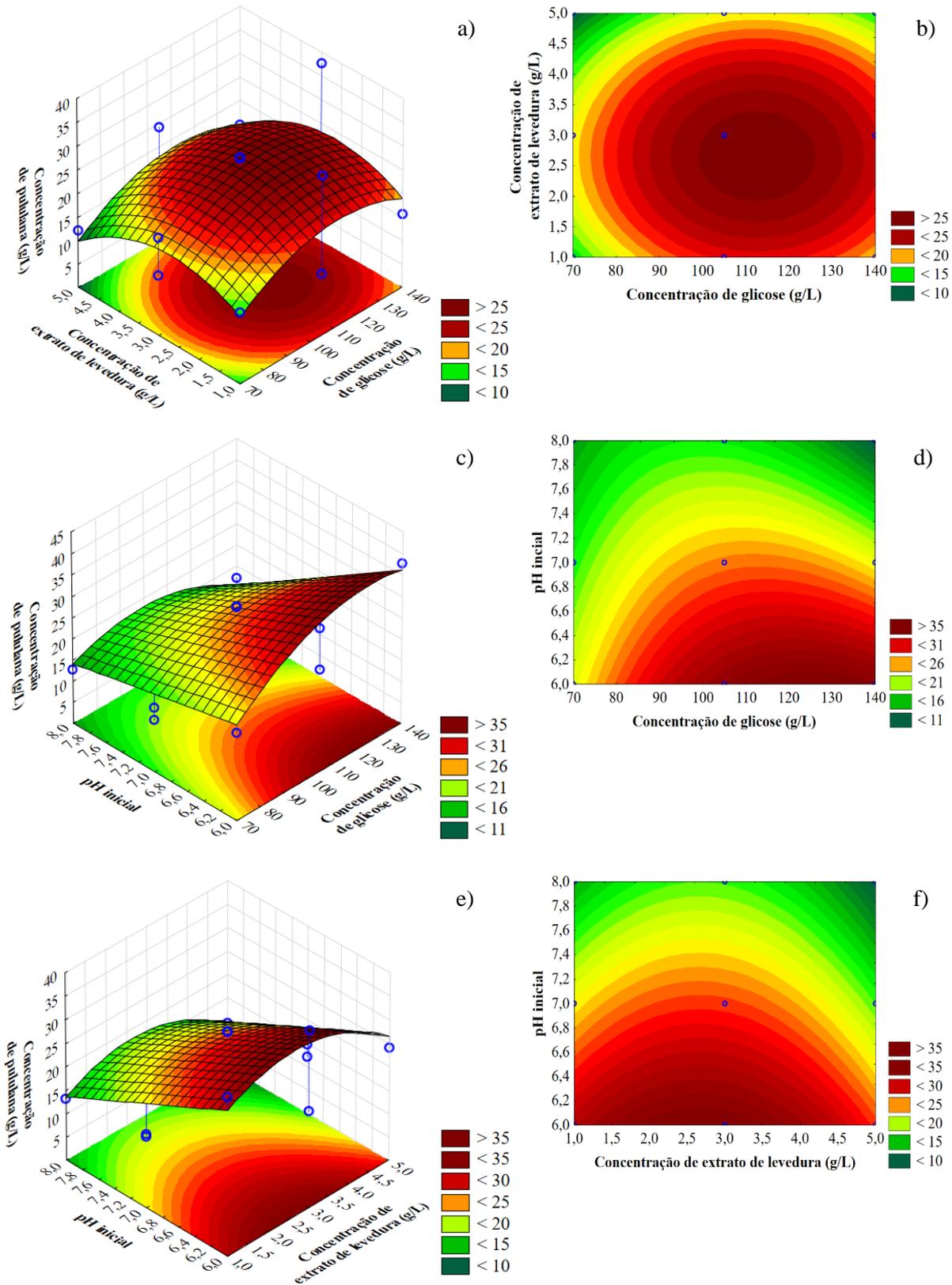
X<sub>1</sub> : Concentração de glicose (g/L)

X<sub>2</sub> : Concentração de extrato de levedura (g/L)

X<sub>3</sub> : pH inicial

Com a finalidade de uma melhor visualização dos efeitos ocasionados pelas variáveis estudadas sobre a produção de pululana, foram traçadas as superfícies de resposta utilizando a Equação 4 (Figura 12).

**Figura 12** – Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para concentração de pululana (g/L) em função de: (a,b) concentração de glicose e de extrato de levedura (para pH inicial de 7,00); (c,f) concentração de glicose e pH inicial (concentração de extrato de levedura de 3,00 g/L); (e,f) concentração de extrato de levedura e pH inicial (concentração de glicose 105 g/L).



Fonte: Autoria própria

Conforme mostrado, houve similaridade de comportamento da linhagem ATCC 42023 (Figura 12) à cepa LB83 (Figura 8), sendo que a máxima produção de pululana foi alcançada em concentrações intermediárias de glicose e extrato de levedura (Figura 12a,b), considerando-se a faixa de valores estudada. Como discutido anteriormente (seção 5.1.2) as características físico-químicas e de produção da pululana indicam uma intensa relação com a razão C/N, mostrando efetivamente que a produção de pululana e biomassa por parte da linhagem ATCC 42023 é susceptível ao conteúdo de carbono e nitrogênio (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017b).

Por sua vez, as Figuras 12c,d,e,f demonstraram que valores menores de pH inicial contribuem para a síntese de pululana para *A. pullulans* ATCC 42023, de forma similar à cepa LB83, que mostrou melhor performance em pH inicial 6,00. De forma semelhante, Lin, Zhang e Thibault (2007) reportam 22,6 g/L de pululana para *A. pullulans* ATCC 42023 após determinarem as condições ótimas de cultivo, as quais corresponderam a pH de 5,50 e concentração de sacarose de 50 g/L. No entanto, Gniewosz e Duszkievicz-Reinhard (2008) ressaltam a importância do controle do pH no processo fermentativo como fator determinante da estrutura morfológica na produção de pululana e biomassa.

### 5.3.3 Análise de Variância (ANOVA) e superfície de resposta para modelo empírico de concentração de biomassa em função das variáveis estudadas

Um modelo de segundo grau em função da concentração de extrato de levedura foi considerado como adequado para descrever a produção de biomassa, o que foi verificado após eliminação dos termos não significativos ( $p > 0,10$ ). Os resultados da ANOVA são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** – ANOVA para um modelo quadrático reduzido para produção de biomassa (g/L) em função das variáveis: concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial.

| Fonte de variação                          | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F     | p-valor              |
|--|-------------------|--------------------|------------------|-------|----------------------|
| Modelo                                     | 267,32            | 2                  | 133,66           | 31,36 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| ( $X_2$ ) Concentração Extrato de levedura | 229,89            | 1                  | 229,89           | 53,94 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| $X_2^2$                                    | 37,43             | 1                  | 37,43            | 8,78  | 0,0118 <sup>a</sup>  |
| Resíduo                                    | 51,14             | 12                 | 4,26             |       |                      |
| Falta de ajuste                            | 50,61             | 10                 | 5,06             | 19,06 | 0,0509               |
| Erro puro                                  | 0,5312            | 2                  | 0,2656           |       |                      |
| Erro Total                                 | 318,47            | 14                 |                  |       |                      |

<sup>a</sup> significativo a 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

Segundo a Tabela 13, o modelo ajustado foi significativo ( $p < 0,05$ ), sem falta de ajuste significativa a 95% de confiança ( $p > 0,05$ ), com valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$  de 0,84 e 0,81, respectivamente. Assim, o modelo foi considerado adequado e é representado pela Equação 5.

$$CB \text{ (g/L)} = 3,73 + 7,43X_2 - 0,79X_2^2 \quad (5)$$

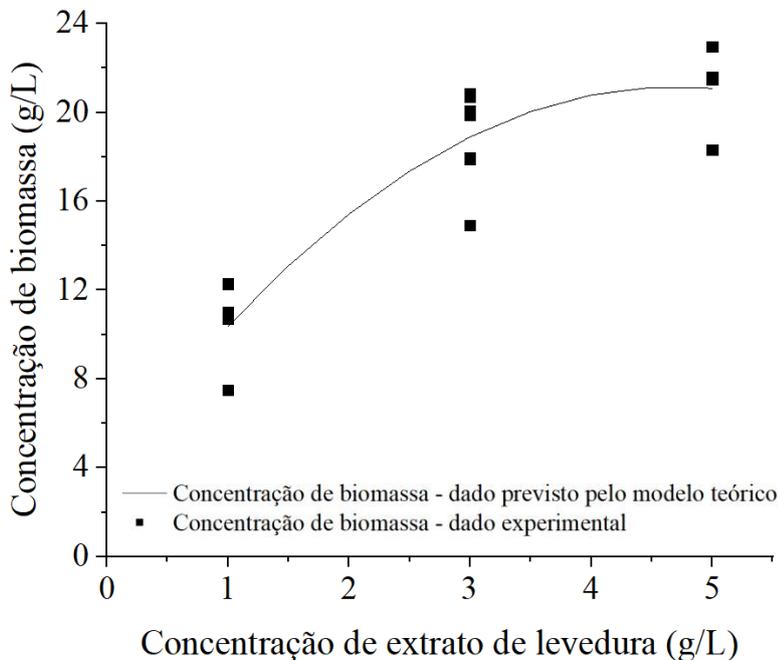
Em que:

CB : Concentração de biomassa (g/L)

$X_2$  : Concentração de extrato de levedura (g/L)

Com a equação do modelo, foi possível traçar uma curva de produção de biomassa (Figura 13), a qual possibilita melhor visualização do efeito da variável extrato de levedura. Desse modo, observa-se que a produção de biomassa foi fortemente influenciada pelo conteúdo de nitrogênio no meio de cultura, sendo que uma concentração de extrato de levedura inferior a 4 g/L resultou em uma redução na concentração celular.

**Figura 13** – Produção de biomassa prevista pelo modelo de segundo grau (linha preta) e dados experimentais de concentração de biomassa (quadrado preto) apresentados na Tabela 10.



Fonte: Autoria própria.

De fato, o estudo realizado por Lin, Zhang e Thibault (2007) demonstraram a susceptibilidade da produção de biomassa para a linhagem ATCC 42023 à quantidade de fonte de nitrogênio no meio. Sharma, Prasad e Choudhury (2013) atribuíram a variação da concentração celular ao tipo de fonte de nitrogênio, sendo que fontes orgânicas como licor de milho favoreceram significativamente a produção de biomassa e bioproduto em comparação ao nitrogênio de fonte inorgânica como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 5.3.4 Otimização da produção de pululana por *A. pullulans* ATCC 42023

Visando a maximizar a produção de pululana pela *A. pullulans* ATCC 42023, procedeu-se com a otimização baseando-se no modelo empírico mostrado na seção 5.3.2. Empregou-se o software Desing-Expert 12 (Stat-Ease, Inc., EUA), utilizando sua ferramenta de otimização numérica dentro das faixas de valores estudadas, tendo como objetivo maximizar a produção de pululana em função das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial. Em seguida, foram realizados experimentos em triplicata para a validação do modelo. As condições ótimas para a variável resposta, assim como os resultados previstos e os obtidos nos experimentos de validação, são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Condições otimizadas para produção de pululana, resultados previstos pelos modelos empíricos para produção de pululana e biomassa e resultados obtidos em dois experimentos de validação realizados, cada um em triplicata com 96h de processo e com razão C/N correspondente a 189,82.

| Condições ótimas              |   |            | Resultado previsto (média ± intervalo de confiança 95%) |                                | Resultado obtido (média ± desvio padrão)               |  |
|-------------------------------|---|------------|---|--------------------------------|--|--|
| Concentração de glicose (g/L) | Concentração de extrato de levedura (g/L) | pH inicial | Concentração de pululana (g/L)                          | Concentração de biomassa (g/L) | Concentração de pululana (g/L)                         | Concentração de biomassa (g/L)                         |
| 126,23                        | 2,66                                      | 6,00       | 37,30 ± 3,72  | 17,94 ± 2,80                   | 29,92 ± 0,28 <sup>a</sup><br>31,17 ± 1,43 <sup>b</sup> | 14,06 ± 0,43 <sup>a</sup><br>11,49 ± 0,36 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Primeiro experimento, <sup>b</sup> segundo experimento.

Fonte: Autoria própria.

Dois experimentos distintos foram realizados durante o processo de validação das condições ótimas. Em ambos casos, os valores médios das triplicatas (Tabela 14) mostraram resultados próximos ao previsto pelo modelo; porém, os resultados não possibilitaram a validação do modelo, embora, tenham apresentado maior estabilidade na produção de pululana quando comparados com os obtidos com a cepa LB83. Possivelmente, fatores como idade do inóculo e lote da fonte de nitrogênio seriam responsáveis pela variação nos resultados das pesquisas (GAUR *et al.*, 2010b; HAMIDI *et al.*, 2019; JIANG, 2010;

SUGUMARAN *et al.*, 2014). Entretanto, a razão produto:biomassa média obtida foi de 1:0,42 em 96h de processo, o que representou uma melhora de 44% na produção de pululana em relação à biomassa produzida com ATCC 42023 obtida por Lin, Zhang e Thibault (2007), a qual resultou em uma razão produto:biomassa de 1:0,79 (produto:biomassa) em 96h de processo.

A partir da variação do teor de glicose no início e ao final do processo fermentativo, foram determinados os parâmetros de transformação de biomassa e produto, assim como a produtividade (Tabela 15).

**Tabela 15** – Fatores de rendimento de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos nas condições ótimas do modelo empírico segundo experimento de validação, com 96h de processo.

| Concentração de pululana (g/L) | Concentração de biomassa (g/L) | Yp/s (g/g)  | Yx/s (g/g)  | Qp g/(L.h)  |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 31,17 ± 1,43                   | 11,49 ± 0,36                   | 0,55 ± 0,05 | 0,18 ± 0,01 | 0,32 ± 0,01 |

Yp/s: Fator de conversão de substrato em produto, Yx/s: Fator de conversão de substrato em células, Qp: Produtividade volumétrica em produto.

**Fonte:** Autoria própria.

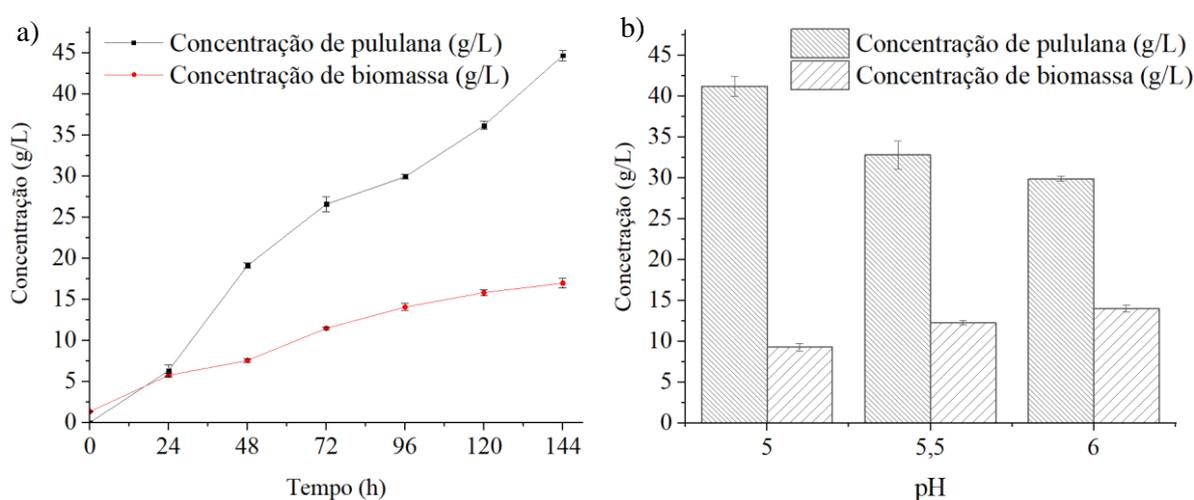
Ao término do processo fermentativo(96h) no segundo experimento, foi determinada a concentração de glicose ( $69,03 \pm 3,09$  g/L) no sobrenadante, o que significaria um consumo aproximado de 45% de glicose por parte da linhagem ATCC 42023. De acordo com a Tabela 15, o micro-organismo produziu 0,55 g de pululana e 0,18 g de biomassa por cada grama de substrato consumido, sendo que para cada hora de processo foi sintetizado 0,32 g/L de biopolímero. No entanto, estudos anteriores reportaram maior produção de pululana com tempos superiores a 96h de processo (HAMIDI *et al.*, 2019; JIANG, 2010; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2015).

A Figura 14a apresenta o perfil cinético de produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas até 144h de processo. Buscando investigar a tendência de maior produção de pululana em valores mais baixos de pH, conforme observado na avaliação do planejamento estatístico, foram realizados experimentos com 96h de processo em diferentes valores de pH inicial (Figura 14b).

O aumento no tempo de fermentação para 144h resultou em um aumento médio de 50% na concentração de pululana quando comparado com o valor obtido em 96h de processo (Figura 14a). Por sua vez, a produção de biomassa alcançou um aumento aproximado de 20% ( $16,97 \pm 0,57$  g/L observados em 144h de fermentação) em relação aos obtidos em 96h de processo ( $14,06 \pm 0,43$  g/L). Ao término das 144h de fermentação, a relação produto:biomassa foi de 1:0,38. De fato, o aumento no tempo de fermentação favoreceu o

processo de síntese do biopolímero. De forma similar, Lin, Zhang e Thibault (2007) observaram a máxima produção de pululana (16 g/L) com a cepa ATCC 42023 em 144h de processo. Contudo, tempos prolongados de fermentação poderiam ocasionar diminuição no conteúdo de pululana, causada pela hidrólise do biopolímero como resposta ao esgotamento da fonte de carbono (CAMPBELL; MCDUGALL; SEVIOUR, 2003; ROUKAS; BILIADERIS, 1995).

**Figura 14** – Experimentos realizados nas condições otimizadas de concentração de glicose (126,23 g/L) e concentração de extrato de levedura (2,66 g/L): a) Perfil cinético de formação de pululana e biomassa (pH inicial de 6,00), b) Produção de pululana e biomassa em 96h de processo em 3 diferentes níveis de pH inicial.



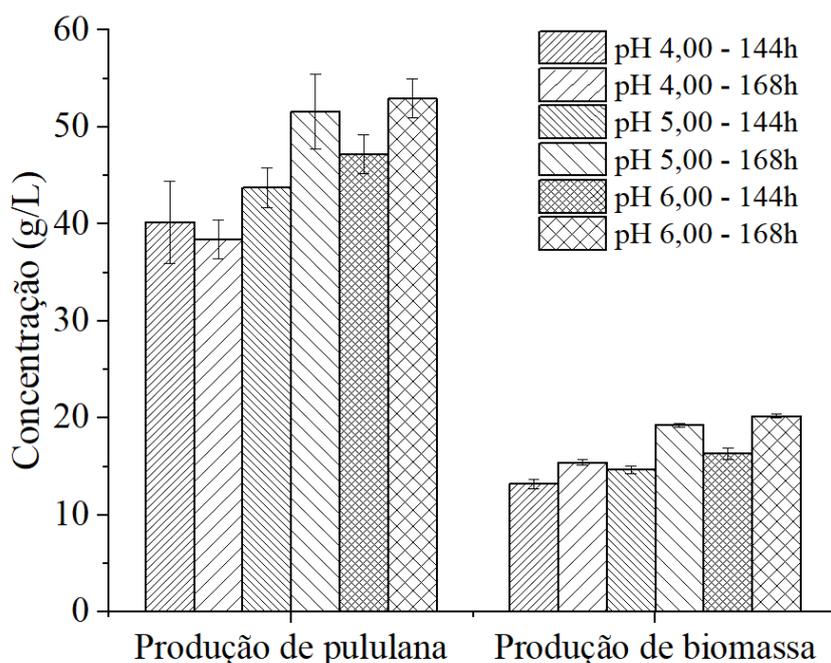
**Fonte:** Autoria própria.

Observa-se também que a máxima produção de pululana junto à menor concentração de biomassa foram atingidas quando o meio de cultura foi ajustado a um pH inicial de 5,00 (Figura 14b). Nestas condições, foram produzidos  $42,22 \pm 1,22$  g/L e  $9,33 \pm 0,46$  g/L de pululana e biomassa, respectivamente. Os valores representam um incremento de 38% do conteúdo de pululana e a redução 33% na produção de biomassa quando comparado com os resultados obtidos nas condições ótimas do modelo com pH inicial de 6,00. Nota-se que, em 96h de fermentação, a produção de pululana com pH inicial de 5,00 ( $42,22 \pm 1,22$  g/L) teve um valor semelhante ao produzido em 144h e pH inicial de 6,00 ( $44,68 \pm 0,65$  g/L), representando uma redução no tempo de fermentação de 33,33%.

Por conseguinte, mantendo-se as condições ótimas de concentração de glicose e concentração de extrato de levedura e ajustando o pH inicial para 5,00, ocorreu um favorecimento da produção de pululana para a cepa de *A. pullulans* ATCC 42023. Em outro

experimento, foi avaliada a produção de pululana e biomassa em 144h e 168h de processo, variando-se o pH inicial do meio de cultura (Figura 15).

**Figura 15** – Experimento realizado em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão) em frasco Erlenmeyer sob luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ), empregando as condições otimizadas de concentração de glicose (126,23 g/L) e concentração de extrato de levedura (2,66 g/L), variando pH inicial do meio de cultura (4,00; 5,00; 6,00) e tempo de fermentação (144 e 168h). Concentração de inóculo:  $1,35 \pm 0,02$ .



**Fonte:** Autoria própria.

Como discutido anteriormente, o incremento no tempo de processo favoreceu a síntese de pululana nos experimentos (Figura 15), tanto com pH 4,00 quanto usando pH inicial 5,00 ou 6,00, quando comparado com os valores obtidos nas condições ótimas do modelo em 96h. Assim, os ensaios com 168h de processo e pH 5,00 e 6,00 apresentaram concentrações similares de pululana ( $51,64 \pm 3,86$  e  $52,94 \pm 2,01$  g/L), as quais foram maiores comparadas ao obtido com pH 4,00 ( $40,20 \pm 4,28$  g/L) no mesmo período de tempo. Realmente, estudos revelaram inibição de enzimas chave da produção de pululana quando o micro-organismo cresce em  $\text{pH} < 4,00$  (PAN *et al.*, 2013).

Com relação à produção de biomassa, esta aumentou com o decorrer do tempo, sendo registradas as máximas concentrações de biomassa empregando pH inicial 5,00 e 6,00 em 168h de fermentação ( $19,28 \pm 0,19$  e  $20,21 \pm 0,18$  g/L, respectivamente), com menor obtido em pH 4,00 ( $15,42 \pm 0,27$  g/L). De forma análoga ao ocorrido com a produção de pululana em pH 4,00 e 168h, a produção de células foi limitada pelo pH inicial do meio de cultura. De forma geral,  $\text{pH} < 4,00$  afetam aos mecanismos metabólicos, reduzindo as atividades

enzimáticas importantes no desenvolvimento celular (BULMER; CATLEY; KELLY, 1987; PAN *et al.*, 2013; XIA; WU; PAN, 2011).

Conforme mostrado na Tabela 16, nos ensaios cujo pH inicial foi 4,00, observou-se um aumento de cerca de 29% na concentração de glicose residual no ensaio em 168h em comparação ao registrado em 144h de processo, possivelmente resultado da hidrólise de  $\beta$ -glucana (DAKE; JADHAV; PATIL, 2004; KONO *et al.*, 2017; SHINGEL, 2004), uma vez que a concentração de pululana manteve-se quase inalterada.

**Tabela 16** – Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos nas condições ótimas de concentração de glicose (126,23 g/L) e de extrato de levedura (2,66 g/L), variando-se o pH inicial do meio de cultura e o tempo de processo.

| Condições de cultura | Concentração de pululana (g/L) | Concentração de biomassa (g/L) | Glicose                           |             |             |             |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                      |                                |                                | residual no meio de cultura (g/L) | Yp/s (g/g)  | Yx/s (g/g)  | Qp g/(L.h)  |
| pH 4,00 e 144h       | 40,20 ± 4,28                   | 13,22 ± 0,50                   | 29,45 ± 4,30                      | 0,41 ± 0,03 | 0,12 ± 0,00 | 0,28 ± 0,03 |
| pH 4,00 e 168h       | 38,43 ± 1,99                   | 15,42 ± 0,27                   | 38,07 ± 1,29                      | 0,44 ± 0,02 | 0,16 ± 0,00 | 0,23 ± 0,01 |
| pH 5,00 e 144h       | 43,75 ± 2,07                   | 14,71 ± 0,39                   | 24,67 ± 1,40                      | 0,43 ± 0,02 | 0,13 ± 0,00 | 0,30 ± 0,01 |
| pH 5,00 e 168h       | 51,64 ± 3,86                   | 19,28 ± 0,19                   | 24,35 ± 1,44                      | 0,51 ± 0,04 | 0,18 ± 0,00 | 0,31 ± 0,02 |
| pH 6,00 e 144h       | 47,19 ± 2,00                   | 16,36 ± 0,58                   | 19,84 ± 1,58                      | 0,44 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 | 0,33 ± 0,01 |
| pH 6,00 e 168h       | 52,94 ± 2,01                   | 20,21 ± 0,18                   | 21,08 ± 1,28                      | 0,50 ± 0,02 | 0,18 ± 0,00 | 0,32 ± 0,01 |

Yp/s: Fator de conversão de substrato em produto, Yx/s: Fator de conversão de substrato em células, Qp: Produtividade volumétrica do produto.

**Fonte:** Autoria própria.

Por outro lado, o fator de conversão de substrato em produto (Yp/s) para os ensaios com pH inicial 4,00 foram similares em ambos os tempos (144h e 168h), indicando que a linhagem ATCC 42023 manteve o direcionamento do metabolismo de produção de pululana a partir de glicose entre 144h e 168h de processo. No caso dos ensaios com pH inicial de 5,00 e 6,00, houve um aumento no Yp/s de cerca de 15% no tempo 168h com relação ao 144h em cada ensaio. Estes resultados indicam empregar 168h como tempo de processo fermentativo. Observou-se também que fator de conversão de substrato em biomassa (Yx/p) aumentou entre 144h e 168h de processo fermentativo em cada ensaio.

A produtividade volumétrica em produto (Qp), por sua vez, foi quase constante para os ensaios cujo pH inicial foi de 5,00 e 6,00, tanto em 144h quanto em 168h; no entanto, houve uma redução de cerca de 17% em 168h com relação ao 144h quando o meio foi ajustado para pH inicial de 4,00.

Baseado nos resultados, e com o intuito de minimizar a possibilidade de contaminação por outro micro-organismos, selecionou-se para continuidade dos experimentos o pH inicial

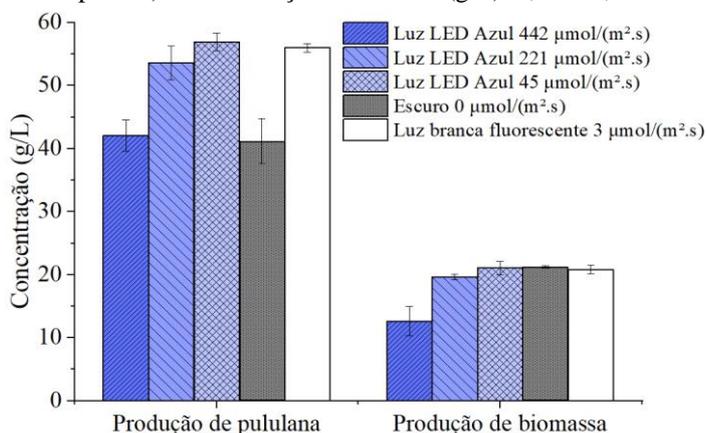
de 5,00 e o tempo de processo de 168h. Procedeu-se então a experimentos de avaliação dos efeitos do tipo de luz e densidade de fluxo de fótons sobre a produção de pululana, biomassa e melanina, conforme discutido na próxima seção.

#### 5.4 Avaliação da produção de pululana, biomassa e melanina em processo fermentativo sob incidência de diferentes comprimentos de onda de luz e diferentes valores de densidade de fluxo de fótons

Geralmente, as cepas selvagens de *A. pullulans* produzem pululana concomitantemente com o pigmento melanina, o qual é removido posteriormente por processos de *downstream*, como carvão ativado ou filtração por membranas (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011c; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Com o intuito de mitigar custos de *downstream*, diversas alternativas têm sido exploradas para inibição da produção de melanina no processo, como a modificação genética ou o controle das condições de cultivo (TERÁN-HILARES *et al.*, 2017, 2019; WANG *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2012).

Assim, realizaram-se experimentos com a cepa selvagem de *A. pullulans* ATCC 42023, nas condições otimizadas conforme seção 5.3.4, com um tempo de processo de 168h e variando-se as condições de iluminação. Foram conduzidas fermentações sob: luz LED azul (comprimento de onda de ~450) com três níveis de densidade de fluxo de fótons (45, 221 e 442  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), ausência de iluminação - escuro (0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente do laboratório (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Avaliou-se, nestes experimentos, a produção de pululana, biomassa (Figura 16) e melanina (Figura 17).

**Figura 16** – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 168h de processo, com cinco diferentes condições de iluminação: Luz LED azul (com densidade de fluxo de fótons de 442, 221 e 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), escuro (0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimentos realizados em frascos Erlenmeyer em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão). Concentração de inóculo (g/L):  $1,32 \pm 0,05$ .



**Fonte:** Autoria própria.

Ao término das 168h do processo fermentativo, produziram-se  $42,04 \pm 2,49$  e  $41,18 \pm 3,56$  g/L de pululana (Figura 16) nas condições de maior densidade de fluxo de fótons com luz LED azul ( $442 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e no escuro ( $0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), respectivamente, sendo estes os menores valores produzidos pela linhagem ATCC 42023 nas condições do experimento. As máximas concentrações de pululana,  $53,57 \pm 2,69$ ,  $56,91 \pm 1,46$  e  $56,00 \pm 0,67$  g/L, por sua vez, foram atingidas na condições de média e baixa densidade fluxo de fótons com luz LED azul (221 e 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), respectivamente, e luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ); em média, foram produzidos 0,33 g de produto/g de açúcar consumido ( $Y_p/s$ ) e obteve-se cerca de 0,33 g/(L.h) de produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) em 168h de processo nas condições de máxima produção de biopolímero (Tabela 17). Os menores valores  $Y_p/s$  e  $Q_p$  foram observadas nos ensaios com maior densidade de fluxo de fótons de luz LED azul e no escuro.

Em todos os casos, as concentrações de pululana obtidas foram maiores que as observadas por Terán-Hilares *et al.* (2017). Estes autores obtiveram de cerca de 20 g/L de pululana empregando a cepa selvagem de *A. pullulans* LB83 cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em 96h assistido por luz LED azul ( $440 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente. Os autores também reportaram, neste caso, 0,48  $Y_p/s$  e 0,28  $Q_p$  em 96h de processo. No entanto, empregaram uma linhagem distinta, com condições de processo, densidade de fluxo de fótons e fonte de carbono diferentes da utilizadas no presente trabalho.

**Tabela 17** – Parâmetros de transformação de substrato em biomassa e em produto e produtividade, obtidos em 168h de processo nos experimentos com diferentes condições de iluminação.

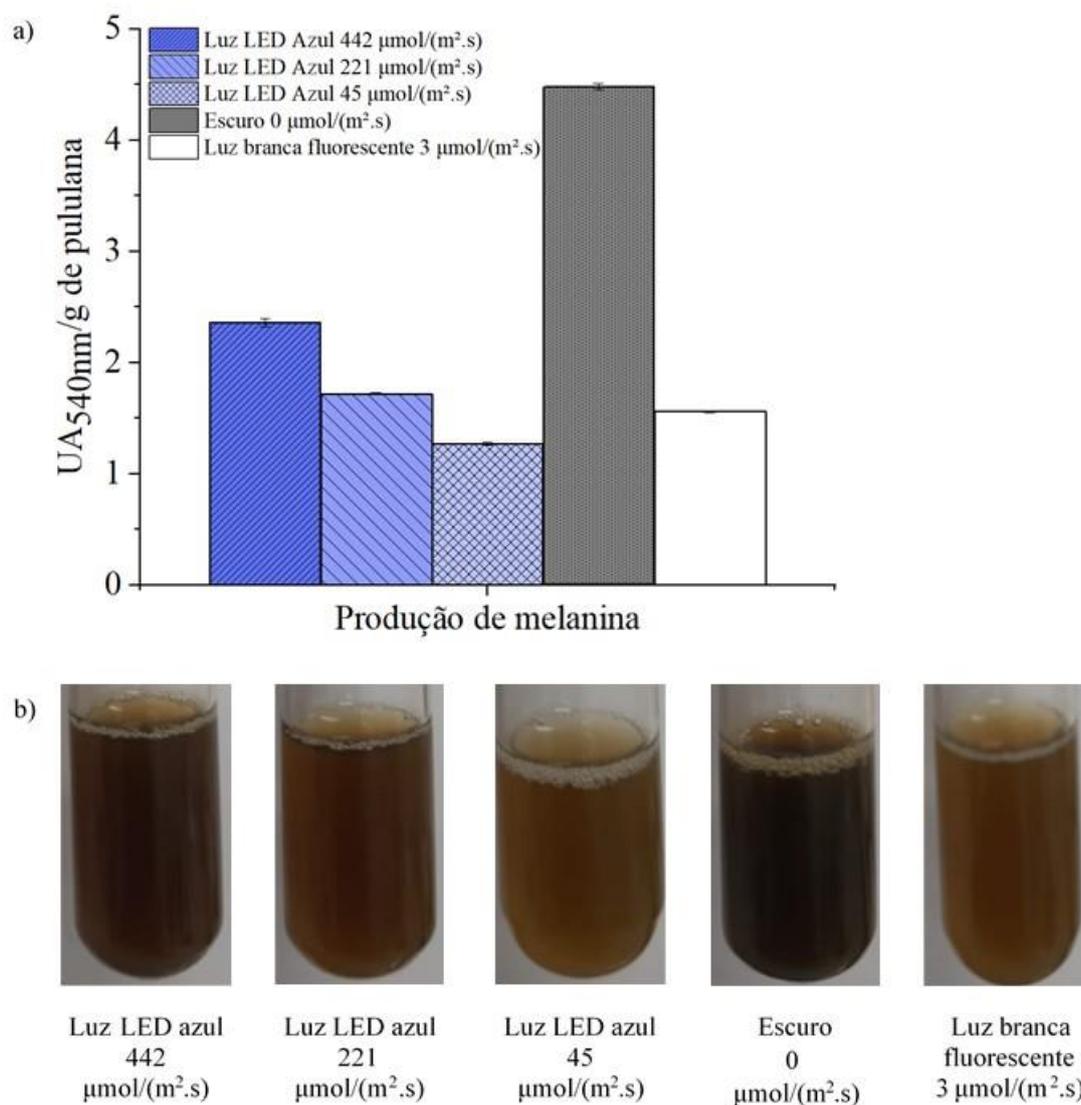
| Condição de<br>iluminação e<br>densidade<br>fluxo de<br>fótons<br>( $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) | Concentração<br>de pululana<br>(g/L) | Concentração<br>de biomassa<br>(g/L) | Glicose<br>residual no<br>meio de<br>cultura (g/L) | $Y_p/s$ (g/g)   | $Y_x/s$ (g/g)   | $Q_p$ g/(L.h)   |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| Luz LED azul<br>442   | $42,04 \pm 2,49$                     | $12,64 \pm 2,33$                     | $28,45 \pm 8,87$                                   | $0,43 \pm 0,06$ | $0,12 \pm 0,03$ | $0,25 \pm 0,01$ |
| Luz LED azul<br>221   | $53,57 \pm 2,69$                     | $19,65 \pm 0,44$                     | $7,74 \pm 3,28$                                    | $0,45 \pm 0,01$ | $0,15 \pm 0,00$ | $0,32 \pm 0,02$ |
| Luz LED azul<br>45  | $56,91 \pm 1,46$                     | $21,07 \pm 1,06$                     | $2,82 \pm 1,29$                                    | $0,46 \pm 0,01$ | $0,16 \pm 0,01$ | $0,34 \pm 0,01$ |
| Escuro<br>0   | $41,18 \pm 3,56$                     | $21,21 \pm 0,21$                     | $15,51 \pm 6,07$                                   | $0,37 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,01$ | $0,25 \pm 0,02$ |
| Luz branca<br>fluorescente<br>3   | $56,00 \pm 0,67$                     | $20,81 \pm 0,69$                     | $2,57 \pm 1,16$                                    | $0,45 \pm 0,00$ | $0,16 \pm 0,00$ | $0,33 \pm 0,00$ |

$Y_p/s$ : Fator de conversão de substrato em produto,  $Y_x/s$ : Fator de conversão de substrato em células,  $Q_p$ : Produtividade volumétrica do produto.

**Fonte:** Autoria própria.

Observou-se também uma produção média de cerca de 21 g/L de biomassa nos ensaios com luz LED azul de média e baixa densidade de fluxo de fótons, no escuro e sob luz branca (Figura 16). No entanto, apenas  $12,64 \pm 2,33$  g/L de biomassa foram produzidos nas condições de maior densidade de fluxo de fótons com luz LED azul, valores similares aos obtidos por Terán-Hilares *et al.* (2017) com a cepa LB83 nas mesmas condições (440  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  de luz LED azul), enquanto que, com luz branca fluorescente, estes autores obtiveram  $15,49 \pm 1,72$  g/L de biomassa.

**Figura 17** – Produção do pigmento melanina (a) expressa em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero ( $\text{UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana) medidas em uma solução aquosa de pululana (12 g/L) obtida em 168h de processo com incidência de cinco diferentes condições de iluminação: Luz LED azul com densidade de fluxo de fótons de 442, 221 e 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , no escuro (0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e sob luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimentos realizados em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão). Concentração de inóculo:  $1,32 \pm 0,05$ . São apresentadas também fotografias (b) de cada solução de pululana obtida.



Fonte: Autoria própria

Com relação à produção do pigmento melanina (Figura 17a), o qual foi produzido junto à pululana, observou-se que a ausência de luz resultou na maior quantidade de pigmento, atingindo  $4,48 \pm 0,03 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana (máximo valor registrado, solução aquosa de pululana de cor obscura – Figura 17b), seguida por  $2,36 \pm 0,04 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana (cor marrom escuro – Figura 17b) obtida usando a maior densidade de fluxo fótons com luz LED azul. Menores valores de absorvância foram obtidos empregando baixa densidade de fluxo de fótons com luz LED azul (cor marrom claro – Figura 17b) e luz branca fluorescente (cor marrom claro – Figura 17b), sendo registrados  $1,27 \pm 0,01$  e  $1,56 \pm 0,01 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana, respectivamente. Para servir de comparação, podem-se observar os resultados de Terán-Hilares *et al.* (2017), os quais, empregando a máxima densidade de fluxo de fótons com luz LED azul ( $440 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), reportaram  $4,46 \pm 0,26 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana, em uma solução aquosa de cor transparente, observando também uma cor escura nas soluções preparadas com pululana obtida nas condições de luz branca ( $45,70 \pm 1,54 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana) e no escuro ( $22,33 \pm 1,21 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana) com a cepa LB83.

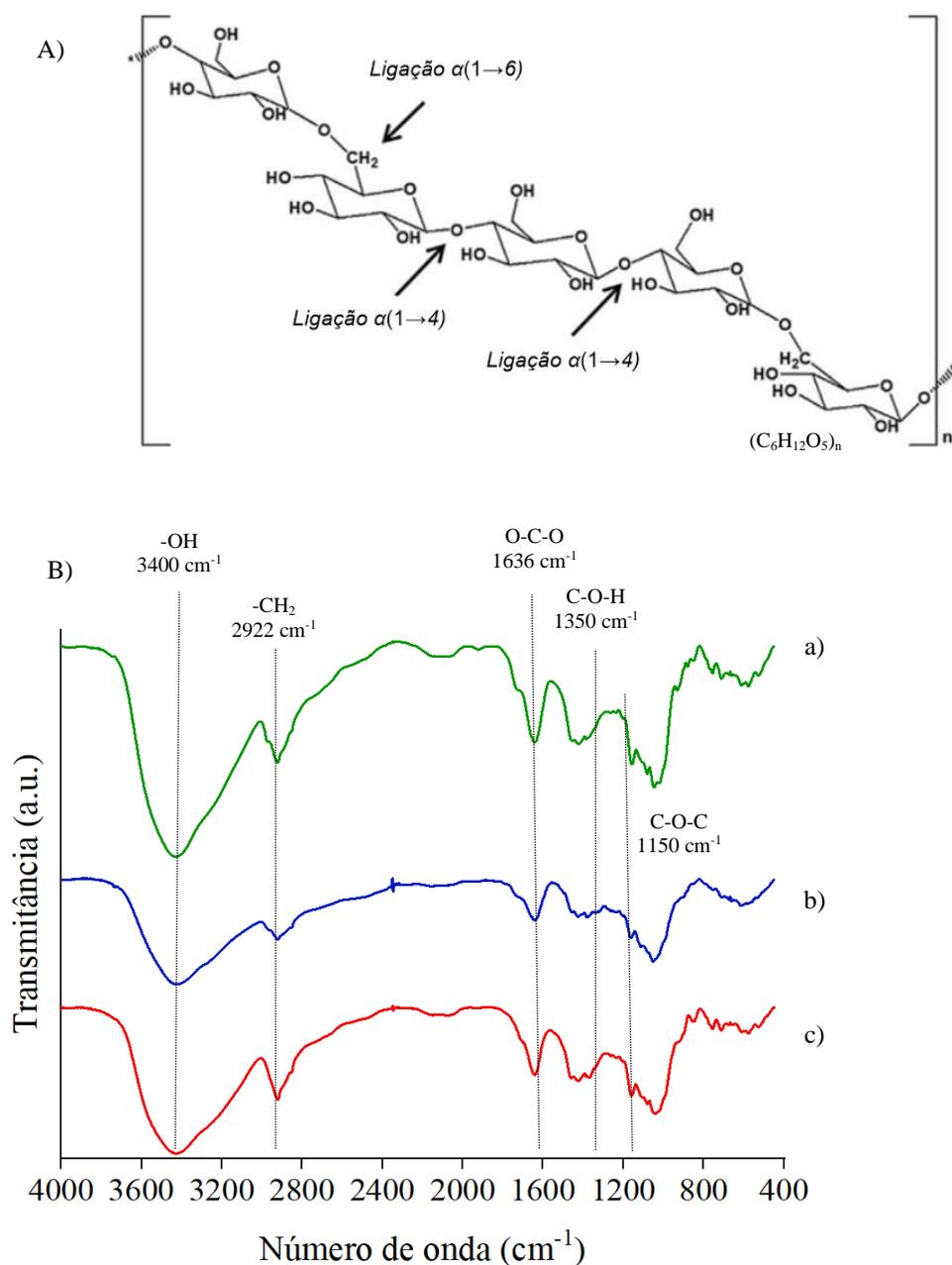
As amostras de pululana produzida nas condições de luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) foram analisadas por FTIR e comparadas à pululana comercial, com o intuito de identificar grupos funcionais e alterações na estrutura do biopolímero.

A análise dos espectros de FTIR (Figura 18) tornou evidente a banda de deformação axial característica dos grupos -OH, localizada em torno de  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , junto com as bandas que aparecem em  $2922$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao carbono saturado (orbitais híbridos  $\text{sp}^3$ ) do grupo C-H (alquila) (CHEN *et al.*, 2015; SABER-SAMANDARI *et al.*, 2014).

Com uma banda única em  $1636 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de alongamento do grupo O-C-O (SABER-SAMANDARI *et al.*, 2014), juntamente com as características do espectro da pululana na região entre  $1500$  e  $650 \text{ cm}^{-1}$  (GNIEWOSZ; DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2008), foi observada grande similaridade entre o espectro da pululana comercial e das amostras de pululana produzidas sob incidência de luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), incluindo a banda referente ao grupo C-O-H ( $1350 \text{ cm}^{-1}$ ) e o alongamento do grupo C-O-C ( $1150 \text{ cm}^{-1}$ ), conforme mencionado anteriormente (SABER-SAMANDARI *et al.*, 2014). Outras bandas de absorção típicas da configuração  $\alpha$  das unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose na pululana foram observadas em  $850 \text{ cm}^{-1}$ , com destaque para as duas principais ligações da pululana (ligações  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  e  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  -D-glicosídica) observadas em  $738$  e  $918 \text{ cm}^{-1}$  (GNIEWOSZ; DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2008;

TERÁN-HILARES *et al.*, 2017). Não foram observadas nenhuma das bandas características da melanina de forma proeminente nas amostras.

**Figura 18** – Representação da estrutura da pululana (A) e Espectro de FTIR (B) da pululana produzida sob a incidência de: a) luz branca fluorescente (linha verde), b) luz LED azul (linha azul), e c) pululana comercial (linha vermelha). As amostras de pululana foram produzidas nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 168h de processo.

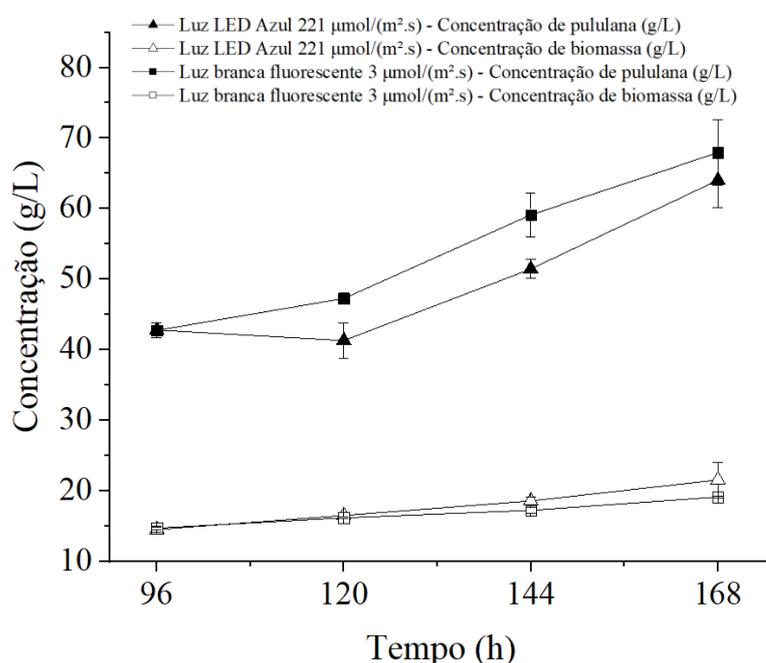


**Fonte:** Figura A: Adaptado de Tabasum *et al.* (2018), Figura B: Autoria própria.

Conforme os resultados mostrados nas Figuras 16 e 17, a luz LED azul (particularmente quando a densidade de fluxo de fótons era de 221 e de 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e a luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) promoveram a produção de pululana ao mesmo tempo em que

reduziram a atividade de síntese do pigmento melanina. Neste sentido, procedeu-se com a comparação da atividade de síntese de pululana, biomassa (Figura 19) e melanina (Figura 20) nas condições de luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), em 168h de processo fermentativo com coleta de amostras a cada 24h a partir de 96h.

**Figura 19** – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) com coleta de amostras cada 24h (a partir de 96h até o término do processo, em 168h), em duas condições de iluminação: Luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca fluorescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão).

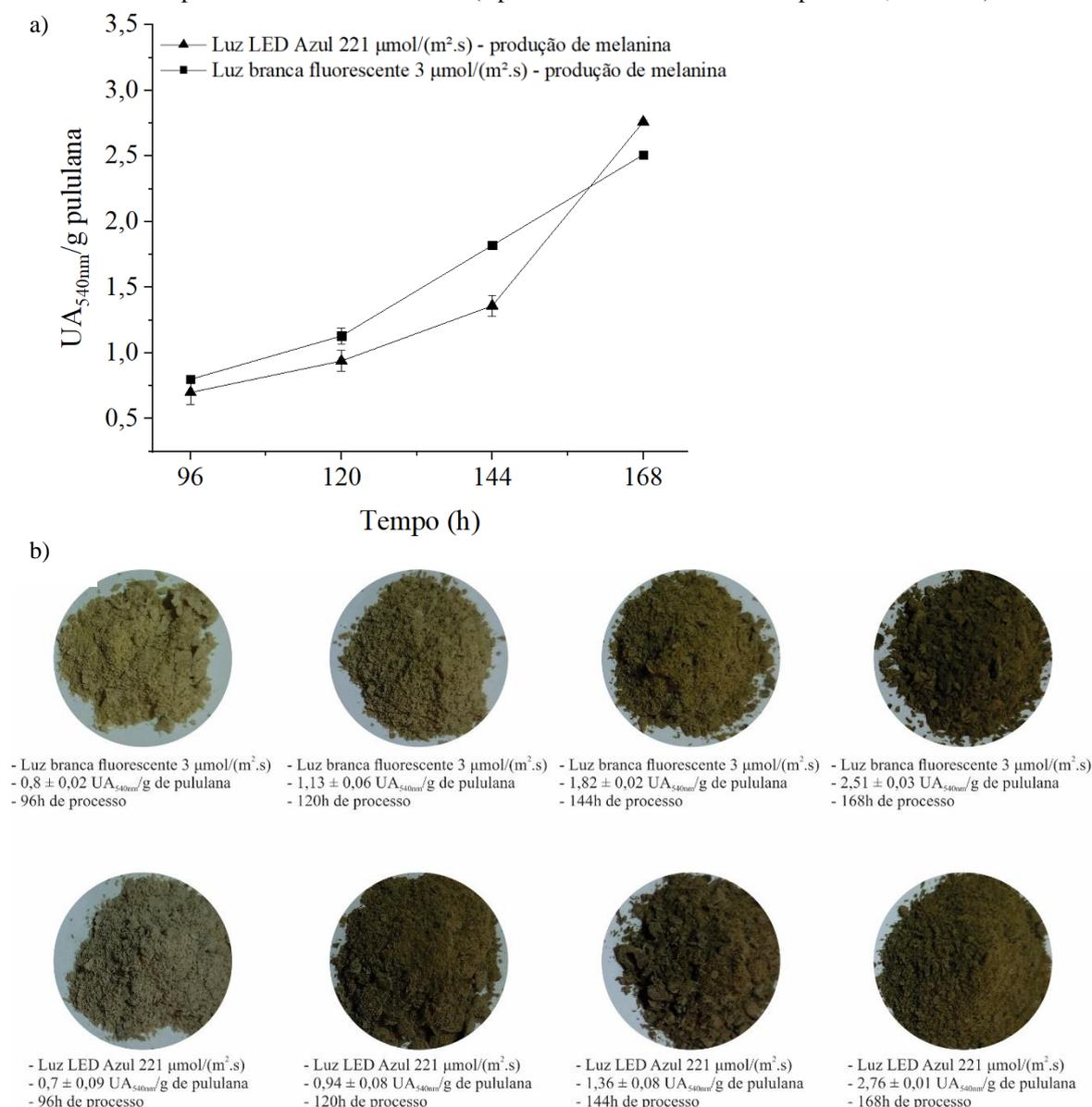


**Fonte:** Autoria própria.

Observou-se similaridade na produção de pululana em 96h (cerca de 42 g/L) e 168h (64 – 68 g/L) tanto com a luz LED azul quanto com a luz branca fluorescente (Figura 19). No entanto, entre 120h e 144h, a luz branca fluorescente resultou em maior concentração do biopolímero em comparação com o uso de luz LED azul (Figura 19). Pode-se observar também que a produção obtida em 168h representou um aumento de cerca de 20% quando comparado aos valores reportados na Tabela 17 e Figura 16 no mesmo período de tempo e de condições de iluminação. Contudo, a produção de biomassa obtida foi similar entre os experimentos dentro da faixa de tempo estudada, e os valores obtidos em 168h foram semelhantes aos registrados na Tabela 17 e Figura 16 no mesmo período e nas mesmas condições de processo. Este fato indicaria maior estabilidade na produção de biomassa nas condições de estudo.

Houve também um aumento de cerca de 60% na produção de melanina ao término das 168h de processo (Figura 20), quando comparado com os valores registrados na Figura 17 ( $1,72 \pm 0,01$  e  $1,56 \pm 0,01$  UA<sub>540nm</sub>/g de pululana para luz LED azul e luz branca fluorescente, respectivamente) no mesmo período tempo para cada condição de iluminação. Assim, foi observado  $2,76 \pm 0,01$  e  $2,51 \pm 0,03$  UA<sub>540nm</sub>/g de pululana, para as amostras produzidas com incidência de luz LED azul e luz branca fluorescente, respectivamente.

**Figura 20** – Formação do pigmento melanina (a) expresso em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero (UA<sub>540nm</sub>/g de pululana) medida em uma solução de pululana (12 g/L). Biopolímero produzido nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) com amostras coletadas cada 24h (a partir de 96h até o término do processo, em 168h), em duas condições de iluminação: Luz LED azul ( $221 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz branca florescente ( $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão). Também são apresentadas fotografias (b) de cada amostra de pululana obtida em cada 24h (a partir de 96h até o termino do processo, em 168h).



Fonte: Autoria própria.

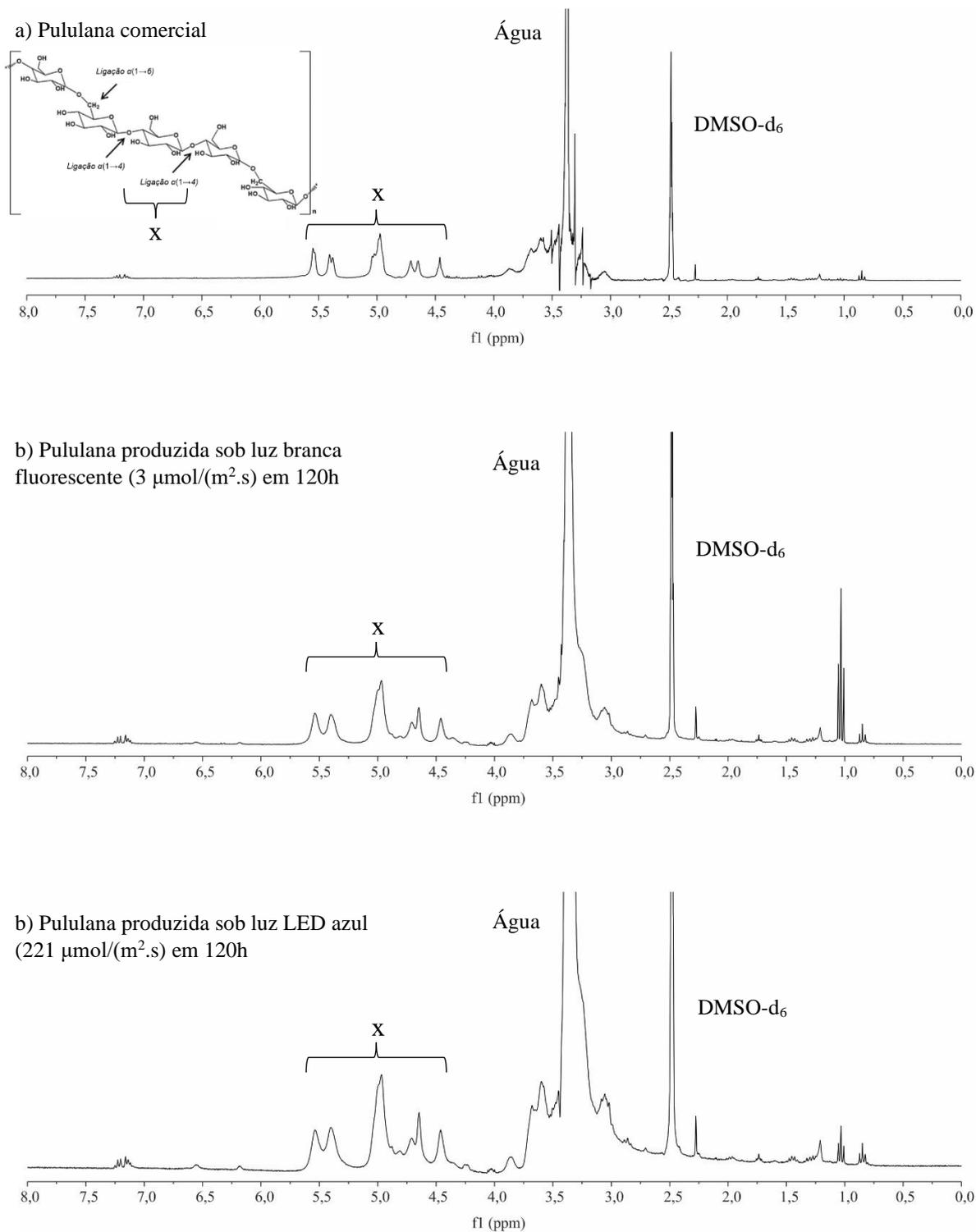
Na Figura 21 observa-se uma comparação entre os espectros de RMN<sup>1</sup>H da pululana comercial (Figura 21a) com as produzidas sob luz branca fluorescente com densidade de fluxo de fótons de 3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  (Figura 21b) e luz LED azul com densidade de fluxo de fótons de 221  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  (Figura 21c), em 120h de processo. Destaca-se que as amostras de pululana produzidas com incidência de luz branca fluorescente e luz LED azul apresentaram picos nas regiões de 5,70 – 4,40 ppm (representada por “x”) semelhantes ao observado na pululana comercial, assim, o próton anomérico da ligação  $\alpha(1\rightarrow6)$  detectou-se no pico 4,97 ppm tanto para as amostras de pululana produzida pelo fungo *A. pullulans* ATCC 42023 quanto da pululana comercial, as ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  foram detectadas no pico 5,55 e 5,41 ppm para pululana comercial, 5,54 e 5,40 ppm para a pululana produzida sob luz branca fluorescente e 5,58 e 5,38 ppm para a pululana produzida sob luz LED azul. Valores similares foram reportados por Chen *et al.* (2019a) e Haghghatpanah *et al.* (2020).

No entanto, os espectros da Figura 21b e 21c apresentaram um tripleto entre 1,01 e 1,06 ppm que não foi observado no espectro da pululana comercial (Figura 21a), sendo de maior intensidade na amostra de pululana produzida com incidência de luz branca fluorescente, sendo que a integral desta em relação às bandas características de pululana foi maior que na pululana produzida com incidência de luz LED azul. O tripleto identificado estaria relacionado aos prótons do grupo metil correspondente ao resíduo de etanol proveniente da precipitação da pululana, sendo que sinais do tripleto correspondente ao grupo metil de amostras de etanol foram detectadas entre a região 1,20 e 1,00 ppm por Zuriarrain *et al.* (2015) e Li *et al.* (2019), respectivamente.

Não foram detectados sinais das estruturas químicas da melanina, assim como do precursor 1,8-dihidroxi-naftaleno nos espectros de RMN<sup>1</sup>H da pululana produzida pelo fungo *A. pullulans* ATCC 42023 (Figura 21b e 21c), uma vez que sinais de dihidroxi-naftaleno são detectado entre as regiões 6,00 e 9,50 ppm (LYČKA; VRBA; VRBA, 2000; RESINS; ALL, 2011; SETHUKUMAR *et al.*, 2012).

Embora não tenham sido detectado sinais de dihidroxi-naftaleno nos espectros de RMN<sup>1</sup>H, a cor da pululana produzida pelo *A. pullulans* ATCC 42023 poderia tratar-se de algum outro bioproduto, como a liamocina, um lipídeo poli-ol formado concomitantemente com a pululana e a melanina (GARAY *et al.*, 2018; MANITCHOTPISIT *et al.*, 2011; SAUR *et al.*, 2019). No entanto, o espectro de RMN<sup>1</sup>H da liamocina mostra picos entre as regiões 3,65 e 4,20 ppm quando utilizado DMSO-d<sub>6</sub> (PRICE *et al.*, 2017). Embora tenham sido detectados picos próximos às regiões correspondentes à liamocina, o excesso de água nas amostras dificultou a identificação.

**Figura 21** – Espectros de RMN<sup>1</sup>H da pululana comercial (a) e das produzidas nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em 120h de processo, em duas condições de iluminação: b) luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e c) luz LED azul (221  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ).

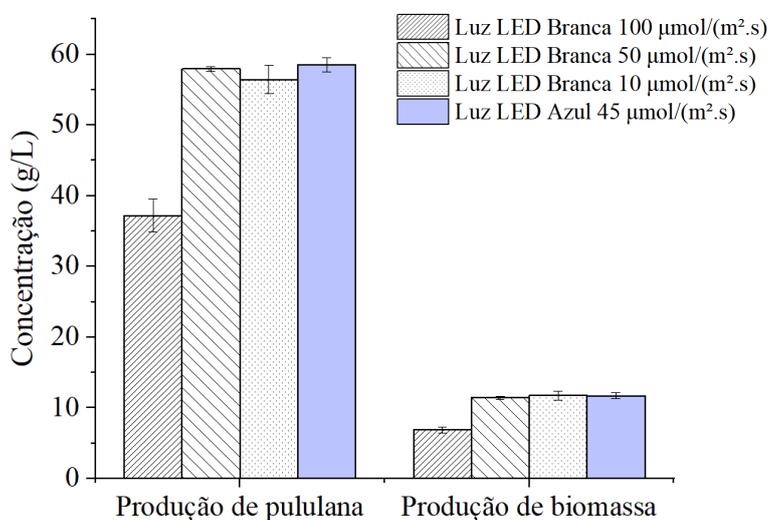


Fonte: Autoria própria.

Efetivamente, a produção de pululana manteve-se elevada nas condições de luz LED branca (particularmente, nas condições de média e baixa densidade de fótons) e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (Figura 22), produzindo-se em média cerca de 57 g/L de pululana. Este valor foi semelhante aos obtido nas condições de  $3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  de luz branca fluorescente ( $56,00 \pm 0,67 \text{ g/L}$ ) e  $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$  de luz LED azul ( $56,91 \pm 1,46 \text{ g/L}$ ) observados na Tabela 17 e Figura 16. No entanto, a maior densidade de fluxo de fótons na luz LED branca resultou em uma redução de cerca de 35% com relação ao máximo valor obtido na mesma condições de comprimento de onda de luz, resultando em  $37,49 \pm 2,32 \text{ g/L}$  de pululana. Os resultados evidenciam que o emprego de elevadas densidades de fluxo de fótons tanto na Luz LED branca (Figura 22) quanto na luz LED azul (Figura 16, Tabela 17) afetam a produção de pululana.

A baixa produção do biopolímero poderia estar relacionada ao fato de ter produzido 40% menos biomassa na condição de máxima densidade de fluxo de fótons na luz LED branca que nas condições de média e baixa densidade de fluxo de fótons na luz LED branca e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (Figura 22). Assim, quando a cepa de *A. pullulans* ATCC 42023 cresceu em um meio com incidência da luz LED branca na máxima densidade de fluxo de fótons ( $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ), o micro-organismo produziu  $6,91 \pm 0,43 \text{ g/L}$  de biomassa, sendo maior a produção de biomassa (na média de  $11,64 \text{ g/L}$ ) nas condições de média e baixa densidade de luz LED branca e azul.

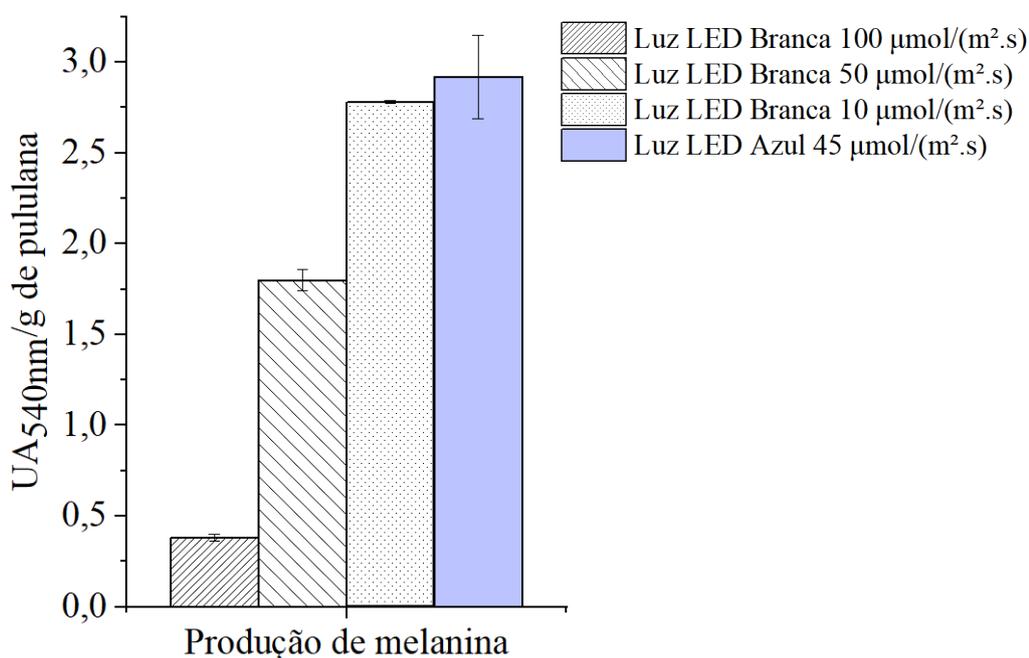
**Figura 22** – Produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas ( $126,23 \text{ g/L}$  de glicose,  $2,66 \text{ g/L}$  de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168 h, com quatro diferentes condições de iluminação: Luz LED branca ( $100, 50$  e  $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão).



**Fonte:** Autoria própria.

Por sua vez, a luz LED branca (particularmente de  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) mostrou ser promissora na redução da atividade de síntese de melanina ( $1,8 \pm 0,06 \text{ UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana, Figura 23) quando relacionada com a produção de pululana observada na Figura 22.

**Figura 23** – Produção do pigmento melanina expresso em Unidades de Absorbância por massa de biopolímero ( $\text{UA}_{540\text{nm}}/\text{g}$  de pululana) medida em uma solução de pululana (12 g/L). O biopolímero foi produzido nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168h, com incidência de quatro diferentes condições de iluminação: Luz LED branca (100, 50 e  $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) e luz LED azul ( $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão).



**Fonte:** Autoria própria.

Mediu-se também a viscosidade dos sobrenadantes obtidos do caldo fermentado após separação da biomassa. A viscosidade aparente ( $\mu_a$ ) de cada sobrenadante avaliado (conforme as condições de cultura apresentadas na Tabela 18) mostrou um comportamento decrescente com o aumento da taxa de cisalhamento ( $1/\text{s}$ ) para cada amostra, indicando que o sobrenadante recuperado ao final de cada processo fermentativo seguiu um comportamento de fluido pseudoplástico.

Quando determinados os valores do índice de consistência ( $\text{Pa.s}^n$ ) e do índice de comportamento do fluido ( $\text{s}^{-1}$ ) da Lei da Potência de Ostwald-de Waele (Equação 1), confirmou-se que o sobrenadante recuperado apresenta um comportamento pseudoplástico. Como observado na Tabela 18, o índice de comportamento de fluido decresce e o índice de

consistência incrementa-se entre os ensaios N° 1-2, 3-4,5-6,12-15,16-19. Segundo a literatura, o aumento dos valores do índice de consistência está associado a um aumento na viscosidade do fluido e a diminuição no valor do índice de comportamento do fluido está associado a um desvio no comportamento do fluido newtoniano (HAMIDI *et al.*, 2019; TERÁN-HILARES *et al.*, 2019).

**Tabela 18** – Parâmetro reológico do sobrenadante obtido após separação das células em cada experimento realizado com a cepa *A. pullulans* ATCC 42023 (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) em diferentes condições de processo.

| N° do ensaio | Condições de cultura  | Viscosidade aparente, Parâmetro reológico |                            |                          |        |
|--------------|---|---|----------------------------|--------------------------|--------|
|              |   | $\mu_a$ (Pa.s) <sup>a</sup>               | $k^b$ (Pa.s <sup>n</sup> ) | $n^c$ (s <sup>-1</sup> ) | $R^2$  |
| 1            | pH inicial 4, 144h  | 0,039                                     | 0,16                       | 0,64                     | 0,9979 |
| 2            | pH inicial 4, 168h  | 0,038                                     | 0,24                       | 0,53                     | 0,9943 |
| 3            | pH inicial 5, 144h  | 0,034                                     | 0,18                       | 0,58                     | 0,9976 |
| 4            | pH inicial 5, 168h  | 0,032                                     | 0,21                       | 0,52                     | 0,9962 |
| 5            | pH inicial 6, 144h  | 0,031                                     | 0,16                       | 0,58                     | 0,9972 |
| 6            | pH inicial 6, 168h  | 0,030                                     | 0,18                       | 0,54                     | 0,9965 |
| 7            | Luz LED azul 442 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h          | 0,039                                     | 0,23                       | 0,54                     | 0,9951 |
| 8            | Luz LED azul 221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h          | 0,034                                     | 0,18                       | 0,58                     | 0,9967 |
| 9            | Luz LED Azul 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h           | 0,037                                     | 0,21                       | 0,55                     | 0,9965 |
| 10           | Escuro 0 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h                  | 0,042                                     | 0,32                       | 0,48                     | 0,9955 |
| 11           | Luz branca fluorescente 3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h | 0,041                                     | 0,28                       | 0,51                     | 0,9966 |
| 12           | Luz LED azul 221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 96h           | 0,047                                     | 0,25                       | 0,58                     | 0,9965 |
| 13           | Luz LED azul 221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 120h          | 0,049                                     | 0,30                       | 0,54                     | 0,9953 |
| 14           | Luz LED azul 221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 144h          | 0,046                                     | 0,29                       | 0,53                     | 0,9949 |
| 15           | Luz LED azul 221 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h          | 0,050                                     | 0,46                       | 0,43                     | 0,9903 |
| 16           | Luz branca fluorescente 3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 96h  | 0,049                                     | 0,23                       | 0,61                     | 0,9966 |
| 17           | Luz branca fluorescente 3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 120h | 0,036                                     | 0,18                       | 0,59                     | 0,9949 |
| 18           | Luz branca fluorescente 3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 144h | 0,033                                     | 0,15                       | 0,61                     | 0,9964 |
| 19           | Luz branca fluorescente 3 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h | 0,038                                     | 0,23                       | 0,54                     | 0,9942 |
| 20           | Luz LED branca 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h        | 0,024                                     | 0,11                       | 0,61                     | 0,9974 |
| 21           | Luz LED branca 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h         | 0,048                                     | 0,38                       | 0,47                     | 0,9952 |
| 22           | Luz LED branca 10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h         | 0,070                                     | 1,31                       | 0,25                     | 0,9965 |
| 23           | Luz LED azul 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ , pH inicial 5 e 168h           | 0,075                                     | 1,59                       | 0,22                     | 0,9948 |

<sup>a</sup> Os valores desta coluna correspondem a medidas realizadas usando *Spindler* SC4-18 em uma taxa de cisalhamento constante (50 s<sup>-1</sup>);

<sup>b</sup>  $k$ , índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>);

<sup>c</sup>  $n$ , índice de comportamento do fluido (s<sup>-1</sup>).

**Fonte:** Autoria própria.

Os valores obtidos nos ensaios N° 22 e 23 da Tabela 18, ressaltam-se por apresentar maior viscosidade com relação aos outros ensaios, ao mesmo tempo em que o índice de consistência para ambos os casos foram maiores que  $1,30 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ , com comportamento como fluido pseudoplástico mais acentuado ( $n < 0,30$ ).

### **5.5 Análise comparativo global da produção de pululana, biomassa e melanina por *A. pullulans* ATCC 42023 na presença e ausência de luz**

As amostras de pululana produzidas por *A. pullulans* ATCC 42023 sob diferentes condições de iluminação (Figura 24), mostraram variabilidade tanto na quantidade quanto na cor final do biopolímero. Por exemplo, a pululana produzida sob incidência de luz LED azul (Figura 24a,b,c) mostrou uma cor verde olivácea, que foi reduzindo-se na intensidade de cor conforme diminuía a densidade de fluxo de fótons, sendo esta redução refletida no decréscimo dos valores de absorbância para melanina, ao mesmo tempo houve aumento na produção do biopolímero e da biomassa.

Sob luz LED branca (Figura 24f,g,h), a pululana apresentou uma cor amarelo claro (Figura 24f) e branca opaca (Figura 24g,h), sendo que a diminuição na densidade de fluxo de fótons na luz LED branca resultou em um aumento gradual nos valores de absorbância das amostras. A produção de biomassa, neste caso, foi menor do que a observada sob luz LED azul. A produção de pululana, por sua vez, foi similar quando se comparou entre si o emprego de cada densidade de fluxo de fótons correspondente a cada tipo de luz (azul e branca).

A ausência da cor verde olivácea na pululana produzida sob luz LED branca, indicaria possível inibição da síntese de melanina na cepa ATCC 42023; porém, os valores de absorbância destas amostras resultaram ser maiores que os registrados para as amostras produzidas sob luz LED azul, sendo possível que a luz LED branca tenha promovido a produção concomitante de outro tipo de bioproduto, como por exemplo, a liamocina. De fato, foi reportado que *A. pullulans* pode produzir liamocina de forma concomitante com a pululana e a melanina (GARAY *et al.*, 2018; MANITCHOTPISIT *et al.*, 2011; SAUR *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2018) sob condições similares às empregados nesta pesquisa.

No entanto, a recuperação de liamocina segue procedimentos diferentes dos empregados para pululana, sendo o caldo de fermentação centrifugado a  $14000 \times g$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 min (TANG *et al.*, 2018), formando assim uma camada de óleo abaixo das células precipitadas. Após retirada do sobrenadante, a biomassa com liamocina segue um processo de lavagem com água destilada e extração por metil-etil-cetona (MANITCHOTPISIT *et al.*, 2011).

Geralmente, a cor inicial da liamocina é branca, variando para amarelo e verde oliváceo por causa da melanina (MANITCHOTPISIT *et al.*, 2014; SAUR *et al.*, 2019), embora estudos realizados por Leathers *et al.* (2016) empregando *A. pullulans* NRRL 50380 observaram cor amarela em liamocina livre de melanina.

**Figura 24** – Fotografias da pululana produzidos nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo, em 168h, com incidência de luz LED azul (442, 221 e 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (a,b,c), escuro (0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (d), luz branca fluorescente (3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (e) e luz LED branca (100, 50 e 10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) (f, g, h). Experimento realizado em frascos Erlenmeyer em triplicata (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão).



**Fonte:** Autoria própria.

Baseado na informação acima, e considerando o fato de que cada caldo de fermentação neste trabalho foi centrifugado a 2860xg a 20 °C por 10 minutos, poderia ser possível indicar que as amostras de pululana produzidas por *A. pullulans* ATCC 42023 estejam contendo vestígios de liamocina, sendo necessário realizar ensaios que comprovem a presença deste bioproduto.

## 6 CONCLUSÕES

- Devido à instabilidade da cepa *A. pullulans* LB83, não foi possível validar o modelo matemático obtido na análise do planejamento experimental do tipo Box-Behnken. Assim, procedeu-se à avaliação de 3 cepas selvagens de *A. pullulans* (*A. pullulans* ATCC 42023, *A. pullulans* ATCC 9348 e *A. pullulans* 15.2). Nestes experimentos selecionou-se a cepa *A. pullulans* ATCC 42023, por apresentar maior produção de pululana com relação à produção de biomassa em 96h de processo;
- O planejamento experimental do tipo Box-Behnken aplicado na avaliação dos efeitos das variáveis concentração de glicose, concentração de extrato de levedura e pH inicial sobre a produção de pululana e biomassa geraram modelos matemáticos adequados que descrevem o comportamento do *A. pullulans* ATCC 42023 nas condições de estudo;
- A cepa *A. pullulans* ATCC 42023 apresentou maior estabilidade na produção de pululana e biomassa nas condições otimizadas (126,23 g/L de glicose, 2,66 g/L de extrato de levedura e pH inicial 5,00) de processo;
- O reajuste do pH inicial para 5,00 e o tempo de processo para 168h contribuíram no aumento da produção de pululana por *A. pullulans* ATCC 42023;
- A utilização de luz LED branca (particularmente com densidade de fluxo de fótons de 50 e 10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ ) no cultivo de *A. pullulans* ATCC 42023 promoveu a produção de pululana de cor clara nas condições otimizadas de processo (com reajuste do pH inicial 5,00 e tempo de processo de 168h), reduzindo a produção do pigmento melanina. Os níveis de absorbância a 540 nm, no entanto, foram maiores em comparação à pululana produzida com incidência de luz LED azul, indicando a possível existência de outro composto ainda não identificado na pululana produzida sob incidência de luz LED branca;
- As amostras de biopolímero produzidas sob incidência de luz LED azul e luz branca fluorescente foram analisadas por FTIR e RMN<sup>1</sup>H e apresentaram perfis semelhantes aos observados com uso de pululana comercial, confirmando este biopolímero como pululana;
- As amostras de sobrenadante obtidas após remoção da biomassa, apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico.

## 7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Esta pesquisa permitiu vislumbrar novas linhas de estudo visando à compreensão do comportamento metabólico do *A. pullulans* em diversas condições de processo, tais como:

- Estudo complementar do efeito das condições de cultivo sobre incidência de outros comprimentos de onda de luz diferentes da branca e azul, variando as densidades de fluxo de fótons;
- Identificação de compostos diferentes do pigmento melanina produzidos de forma concomitante à pululana sob incidência de diferentes comprimentos de onda de luz e variando a densidade de fluxo de fótons;
- Realizar o estudo das propriedades reológicas das soluções aquosas de pululana obtidas sob incidência de diferentes comprimentos de onda de luz, variando a densidade de fluxo de fótons;
- Realizar estudos comparativos variando a fonte de carbono e nitrogênio, visando à redução dos custos de produção;
- Realizar a caracterização por DSC, TGA, GPC, SEM e XDR das amostras de pululana obtidas sob incidência de diferentes comprimentos de onda de luz, variando a densidade de fluxo de fótons e variando a fonte de carbono e nitrogênio;
- Avaliar as modificações morfológicas da cepa *A. pullulans* ATCC 42023 promovidas pela variação da fonte de carbono e nitrogênio, comprimento de onda de luz e densidade de fluxo de fótons;
- Estudo da produção de pululana empregando meios baseados em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

- AAMIR, M. *et al.* In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against fusarium wilt in tomato. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. OCT, p. 1–28, 2018.
- ABDEL HAFEZ, A. M. *et al.* Bioconversion of various industrial by-products and agricultural wastes into pullulan. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1416–1425, 2007.
- AN, C. *et al.* Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 180–185, jan. 2017.
- ARCURI, S. L. *et al.* Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 3, p. 475–487, 2014.
- ASHTER, S. A. Overview of Biodegradable Polymers. In: ASHTER, S. A. (Ed.). **Introduction to Bioplastics Engineering**. [s.l.] William Andrew Publishing, 2016. p. 19–30.
- AUDET, J.; LOUNES, M.; THIBAUT, J. Pullulan fermentation in a reciprocating plate bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 4, p. 209–214, 1996.
- BARNES, S. J. Out of sight, out of mind: Plastic waste exports, psychological distance and consumer plastic purchasing. **Global Environmental Change**, v. 58, n. July, p. 101943, 2019.
- BERMEJO, J. M. *et al.* Influence of pH on the transition from yeast-like cells to chlamydozoospores in *Aureobasidium pullulans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 5, p. 385–392, 1981a.
- BERMEJO, J. M. *et al.* Influence of carbon and nitrogen sources on the transition from yeast-like cells to chlamydozoospores in *Aureobasidium pullulans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 2, p. 107–119, mar. 1981b.
- BISCHOFF, K. M. *et al.* Susceptibility of *Streptococcus suis* to lincosamides from *Aureobasidium pullulans*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 291–294, 2018.
- BROWN, R. G.; HANIC, L. A.; HSIAO, M. Structure and chemical composition of yeast chlamydozoospores of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 163–168, 1 fev. 1973.
- BRUMANO, L. P. *et al.* Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 264–272, 2017.
- BRYAN, R. *et al.* The effects of gamma radiation, UV and visible light on ATP levels in yeast cells depend on cellular melanization. **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 945–949, 2011.
- BULIGA, G. S.; BRANT, D. A. Temperature and molecular weight dependence of the unperturbed dimensions of aqueous pullulan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, n. 2, p. 71–76, abr. 1987.
- BULMER, M. A.; CATLEY, B. J.; KELLY, P. J. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 362–365, 1987.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115–1136, 1998.
- CAMPBELL, B. S. *et al.* Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production?. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 225–228, 2004.
- CAMPBELL, B. S.; MCDUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Why do exopolysaccharide yields

- from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation?. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 104–112, 2003.
- CATLEY, B. J. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by *Pullularia pullulans*. **Appl Microbiol**, v. 22, n. 4, p. 650–654, 1971a.
- CATLEY, B. J. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. **Appl Microbiol**, v. 22, n. 4, p. 641–649, 1971b.
- CATLEY, B. J. The extracellular polysaccharide, pullulan, produced by *Aureobasidium pullulans*: A Relationship between elaboration rate and morphology. **Microbiology**, v. 120, p. 265–268, 1980.
- CATLEY, B. J.; MCDOWELL, W. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Research**, v. 103, n. 1, p. 65–75, maio 1982.
- CHEN, G. *et al.* Pullulan production from synthetic medium by a new mutant of *Aureobasidium pullulans*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 963–969, 26 nov. 2017.
- CHEN, G. *et al.* Optimization and characterization of pullulan production by a newly isolated high-yielding strain *Aureobasidium melanogenum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 557–566, 2019.
- CHEN, L. *et al.* New bifunctional-pullulan-based micelles with good biocompatibility for efficient co-delivery of cancer-suppressing p53 gene and doxorubicin to cancer cells. **RSC Advances**, v. 5, n. 115, p. 94719–94731, 2015.
- CHEN, L. *et al.* Improved pullulan production by a mutant of *Aureobasidium melanogenum* TN3-1 from a natural honey and capsule shell preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 268–277, 2019.
- CHEN, W. Q. *et al.* Sustainable cycles and management of plastics: A brief review of RCR publications in 2019 and early 2020. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 159, n. April, 2020.
- CHEN, Y. *et al.* Production of pullulan from xylose and hemicellulose hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* AY82 with pH control and DL-dithiothreitol addition. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 2, p. 282–288, 13 mar. 2014.
- CHENG, K. C. *et al.* Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 353–359, jun. 2010.
- CHENG, K. C. *et al.* Effects of initial ammonium ion concentration on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* and its modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 115–122, mar. 2011.
- CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 853–861, 20 abr. 2010.
- CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 2, p. 99–109, 18 abr. 2011a.
- CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Continuous pullulan fermentation in a biofilm reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 921–927, 16 maio 2011b.
- CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 29–44, 29 out. 2011c.
- CHI, Z. *et al.* Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast.

**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 793–804, 7 abr. 2009.

CHI, Z. *et al.* Poly( $\beta$ -l-malic acid) (PMLA) from *Aureobasidium spp.* and its current proceedings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3841–3851, 14 maio 2016.

CHOUDHURY, A. R.; BHATTACHARYYA, M. S.; PRASAD, G. S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 232–237, jul. 2012.

DAKE, M. S.; JADHAV, J. P.; PATIL, N. B. Induction and properties of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanase from *Aureobasidium pullulans*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 58–64, 2004.

DUAN, X. *et al.* Influence of different sugars on pullulan production and activities of  $\alpha$ -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 587–593, set. 2008.

FENG, B. *et al.* Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1781–1794, 2001.

FINLAY, A. R. Cellular communication and control of dimorphic behaviour in *Aureobasidium pullulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, n. 2, p. 227–233, 1987.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KALANTZI, O.; AGGELIS, G. Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 155–162, 1998.

GARAY, L. A. *et al.* Extracellular fungal polyol lipids: A new class of potential high value lipids. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 397–414, 2018.

GAUR, R. *et al.* *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 7989–7997, 2010a.

GAUR, R. *et al.* Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for a novel pullulan-producing fungus, *Eurotium chevalieri*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 1035–1043, 2010b.

GEORGE, A. *et al.* A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 329–338, 2020.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 5–6, p. 503–510, 17 dez. 1996.

GNIEWOSZ, M.; DUSZKIEWICZ-REINHARD, W. Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 431–438, 2008.

GÖKSUNGUR, Y.; UZUNOĞULLARI, P.; DAĞBAĞLI, S. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1330–1337, 30 jan. 2011.

HAGHIGHATPANAH, N. *et al.* Optimization and characterization of pullulan produced by a newly identified strain of *Aureobasidium pullulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 305–313, 2020.

HAMIDI, M. *et al.* Production optimization, characterization and gene expression of pullulan from

- a new strain of *Aureobasidium pullulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 725–735, 2019.
- HAN, Y.; LV, S. Synthesis of chemically crosslinked pullulan/gelatin-based extracellular matrix-mimetic gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1262–1270, 2019.
- HAWKES, M. *et al.* *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 3, p. 209–213, 2005.
- HII, S. L. *et al.* Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2012, n. October 2014, p. 1–14, 2012.
- HUYSMAN, S. *et al.* Performance indicators for a circular economy: A case study on post-industrial plastic waste. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 120, p. 46–54, 2017.
- IBRAHIM, S. *et al.* Biopolymers From Crop Plants. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–10.
- ISRAILIDES, C. *et al.* Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 3, p. 203–209, 1994.
- JIANG, H. *et al.* Both a PKS and a PPTase are involved in melanin biosynthesis and regulation of *Aureobasidium melanogenum* XJ5-1 isolated from the Taklimakan desert. **Gene**, v. 602, p. 8–15, 2017.
- JIANG, H. *et al.* Macromolecular pullulan produced by *Aureobasidium melanogenum* 13-2 isolated from the Taklimakan desert and its crucial roles in resistance to the stress treatments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 429–436, 2019.
- JIANG, L. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 414–417, 2010.
- JIANG, L.; WU, S.; KIM, J. M. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 1085–1088, 2011.
- KABIR, E. *et al.* Prospects of biopolymer technology as an alternative option for non-degradable plastics and sustainable management of plastic wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, p. 120536, 2020.
- KATO, T. *et al.* Solution properties and chain flexibility of pullulan in aqueous solution. **Biopolymers**, v. 21, n. 8, p. 1623–1633, 1982.
- KIMOTO, T.; SHIBUYA, T.; SHIOBARA, S. Safety studies of a novel starch, pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3–4, p. 323–329, 1997.
- KOGEJ, T. *et al.* Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 203–209, 2004.
- KONO, H. *et al.* NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 876–886, 2017.
- KUMAR, A.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 103–117, abr. 2007.
- KUMAR, S. S. D.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Biopolymer-based composites for medical applications. In: **Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 20–28.

- LAVERS, J. L.; BOND, A. L. Ingested plastic as a route for trace metals in Laysan Albatross (*Phoebastria immutabilis*) and Bonin Petrel (*Pterodroma hypoleuca*) from Midway Atoll. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, p. 493–500, 2016.
- LAZARIDOU, A. *et al.* Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1–2, p. 122–132, jul. 2002.
- LEATHERS, T. D. *et al.* Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 231–239, 1988.
- LEATHERS, T. D. *et al.* Production of anti-streptococcal liamocins from agricultural biomass by *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 1–7, 2016.
- LEE, J. K. *et al.* 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-Melanin biosynthesis inhibitorss increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-Melanin inhibits erythrose reductase. **Society**, v. 69, n. 6, p. 3427–3434, 2003.
- LI, G. B. *et al.* Selective adsorption of water, methanol, and ethanol by naphthalene diimide-based coordination polymers with constructed open Cu<sup>2+</sup> metal sites and separation of ethanol/acetonitrile. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 1995–2000, 2019.
- LI, X. *et al.* HLC/pullulan and pullulan hydrogels: Their microstructure, engineering process and biocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1046–1057, 2016.
- LI, Y. *et al.* Taxonomy of *Aureobasidium spp.* and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 228–237, 2015.
- LIN, Y.; ZHANG, Z.; THIBAUT, J. *Aureobasidium pullulans* batch cultivations based on a factorial design for improving the production and molecular weight of exopolysaccharides. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 820–827, 2007.
- LIU, L. *et al.* Effect of pullulan on molecular chain conformations in the process of starch retrogradation condensed matter. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 736–743, 2019.
- LIU, N.-N. *et al.* Simultaneous production of both high molecular weight pullulan and oligosaccharides by *Aureobasidium melanogenum* P16 isolated from a mangrove ecosystem. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1016–1024, set. 2017.
- LIU, N.-N. *et al.*  $\alpha$ -Amylase, glucoamylase and isopullulanase determine molecular weight of pullulan produced by *Aureobasidium melanogenum* P16. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 727–734, out. 2018.
- LIU, S.; STEINBÜCHEL, A. Investigation of poly( $\beta$ -L-malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 273–278, 1996.
- LORENZINI, M.; ZAPPAROLI, G. Yeast-like fungi and yeasts in withered grape carposphere: Characterization of *Aureobasidium pullulans* population and species diversity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, n. August 2018, p. 223–230, 2019.
- LOTRAKUL, P. *et al.* Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 253–257, 2009.
- LYČKA, A.; VRBA, Z.; VRBA, M. <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra and azo-hydrazone tautomerism of some phenylazo compounds derived from 1,3- and 1,5-dihydroxynaphthalene. **Dyes and Pigments**, v. 47, n. 1–2, p. 45–51, 2000.

MANITCHOTPISIT, P. *et al.* Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1151–1157, 2011.

MANITCHOTPISIT, P. *et al.* *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2199–2204, 22 ago. 2014.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2018.

MULDER, K. F. Sustainable consumption and production of plastics? **Technological Forecasting and Social Change**, v. 58, n. 1–2, p. 105–124, 1998.

OHTOMO, S.; OHNUMA, S. Psychological interventional approach for reduce resource consumption: Reducing plastic bag usage at supermarkets. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 84, p. 57–65, 2014.

ORR, D. *et al.* Culture conditions affect the chemical composition of the exopolysaccharide synthesized by the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 691–698, 2009.

OSIŃSKA-JAROSZUK, M. *et al.* Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1823–1844, 4 dez. 2015.

PAN, S. *et al.* Influence of controlled pH on the activity of UDPG-pyrophosphorylase in *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 629–632, 2013.

PIHET, M. *et al.* Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2009.

POLLOCK, T. J.; THORNE, L.; ARMENTROUT, R. W. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 877–883, 1992.

POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. *et al.* Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. In: **Melanin**. [s.l.] InTech, 2017.

PONNUSAMI, V.; GUNASEKAR, V. Production of pullulan by microbial fermentation. In: **Polysaccharides**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 581–596.

POULIOT, J. M. *et al.* Adhesion of *Aureobasidium pullulans* is controlled by uronic acid based polymers and pullulan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1122–1131, mar. 2005.

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; KHANDA, S. M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 540–549, 2013.

PRASONGSUK, S. *et al.* The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 2, p. 129–140, 27 mar. 2018.

PRICE, N. P. *et al.* Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. **Carbohydrate Research**, v. 370, p. 24–32, 2013.

PRICE, N. P. *et al.* Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 2, p. 136–141, 2017.

PROVENCHER, J. F. *et al.* A horizon scan of research priorities to inform policies aimed at reducing the harm of plastic pollution to biota. **Science of The Total Environment**, v. 102, p. 139381, maio 2020.

RAMOS, S.; GARCÍA, I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 64, n. 1, p. 129-135, 1975.

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.

REESLEV, M. *et al.* The ability of the yeast form of *Aureobasidium pullulans* to elaborate exopolysaccharide in chemostat culture at various pH values. **Mycological Research**, v. 101, n. 6, p. 650–652, jun. 1997.

RESINS, B.; ALL, E. B. V. <sup>1</sup>H-NMR Spectra. In: HATSUO ISHIDA, T. A. (Ed.). **Handbook of Benzoxazine Resins**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 653–658.

RONEN, M.; GUTERMAN, H.; SHABTAI, Y. Monitoring and control of pullulan production using vision sensor. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 3, p. 243–249, 2002.

ROTHMAN, L. B.; CABIB, E. Regulation of glycogen synthesis in the intact yeast cell. **Biochemistry**, v. 8, n. 8, p. 3332–3341, 1969.

ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 27–44, 1995.

ROUKAS, T.; MANTZOURIDOU, F. Effect of the aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheological properties in an airlift reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 371–376, 2001.

RYBERG, M. W. *et al.* Global environmental losses of plastics across their value chains. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 151, n. August, p. 104459, 2019.

RYDZ, J. *et al.* Present and future of biodegradable polymers for food packaging applications. In: **Biopolymers for Food Design**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 431–467.

SABER-SAMANDARI, S. *et al.* Efficient removal of anionic and cationic dyes from an aqueous solution using pullulan-graft-polyacrylamide porous hydrogel. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 11, 2014.

SAMSON, R. A. Cellular constitution, water and nutritional needs, and secondary metabolites. In: **Environmental Mycology in Public Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 5–15.

SAUR, K. M. *et al.* A pH shift induces high-titer liamocin production in *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 4741–4752, 25 jun. 2019.

SENA, R. F. *et al.* Enhanced production of pullulan by two strains of *A. pullulans* with different concentrations of soybean oil in sucrose solution in batch fermentations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 507–515, dez. 2006.

SEO, H. P. *et al.* Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 293–299, 2004.

SETHUKUMAR, A. *et al.* NMR spectral and structural studies on some xanthenones and their thiosemicarbazone derivatives: Crystal and molecular structure of 12-(2-chlorophenyl)-8,9,10,12-tetrahydrobenzo[a]xanthen-11-one. **Journal of Molecular Structure**, v. 1008, p. 8–16, 2012.

SHARMA, N.; PRASAD, G. S.; CHOUDHURY, A. R. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 95–101, 2013.

SHENG, L.; TONG, Q.; MA, M. Why sucrose is the most suitable substrate for pullulan

- fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234? **Enzyme and Microbial Technology**, v. 92, p. 49–55, 2016.
- SHIN, Y. C. *et al.* Production of pullulan by a fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 9, p. 621–624, 1987.
- SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 3, p. 447–460, fev. 2004.
- SHUKLA, A. *et al.* Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. **European Polymer Journal**, v. 119, n. July, p. 298–310, 2019.
- SIMON, L.; CAYE-VAUGIEN, C.; BOUCHONNEAU, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 5, p. 979–985, 1 maio 1993.
- SINGH, R. S.; KAUR, N. Understanding response surface optimization of medium composition for pullulan production from de-oiled rice bran by *Aureobasidium pullulans*. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1507–1520, 2019.
- SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, n. March, p. 46–57, 2019.
- SINGH, R. S.; SAINI, G. K. Pullulan-hyperproducing color variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1 newly isolated from phylloplane of *Ficus* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3896–3899, jun. 2008.
- SINGH, R. S.; SAINI, G. K. Biosynthesis of pullulan and Its applications in food and pharmaceutical industry. In: **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 509–553.
- SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 515–531, set. 2008.
- SLINEY, D. H. What is light? the visible spectrum and beyond. **Eye (Basingstoke)**, v. 30, n. 2, p. 222–229, 2016.
- SRIKANTH, S. *et al.* Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 7–12, 2014.
- SUGUMARAN, K. R. *et al.* Statistical studies on high molecular weight pullulan production in solid state fermentation using jack fruit seed. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 854–860, out. 2013.
- SUGUMARAN, K. R. *et al.* Statistical optimization of pullulan production from Asian palm kernel and evaluation of its properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 229–235, 2014.
- SUGUMARAN, K. R.; JOTHI, P.; PONNUSAMI, V. Bioconversion of industrial solid waste - Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 22–30, jan. 2014.
- SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Statistical modeling of pullulan production and its application in pullulan acetate nanoparticles synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 867–876, nov. 2015.
- SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Conventional optimization of aqueous extraction of pullulan in solid-state fermentation of cassava bagasse and Asian palm kernel. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 204–208, abr. 2017a.

- SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 573–591, out. 2017b.
- TABASUM, S. *et al.* A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 603–632, dez. 2018.
- TANAKA, K. *et al.* Piece-by-piece analysis of additives and manufacturing byproducts in plastics ingested by seabirds: Implication for risk of exposure to seabirds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 145, n. May, p. 36–41, 2019.
- TANG, R. R. *et al.* Overexpression of a pyruvate carboxylase gene enhances extracellular liamocin and intracellular lipid biosynthesis by *Aureobasidium melanogenum* M39. **Process Biochemistry**, v. 69, n. 5, p. 64–74, 2018.
- TERÁN-HILARES, R. *et al.* Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 76–81, abr. 2017.
- TERÁN-HILARES, R. *et al.* Exopolysaccharide (pullulan) production from sugarcane bagasse hydrolysate aiming to favor the development of biorefineries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 169–177, 2019.
- U.S. CONGRESS, O. OF T. A. Biopolymers : Making materials nature's way september 1993. **Office of Technology Assessment**, n. September, p. 1–80, 1993.
- UN ENVIRONMENT. Mapping of global plastics value chain and plastics losses to the environment (with a particular focus on marine environment). Nairobi, Kenya: [s.n.]. United Nations Environment Programme, 2018. v 1, p 1 - 99
- VASA, P. Strong Light-Matter Interaction. In: **digital Encyclopedia of Applied Physics**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2019. p. 1–30.
- VELMURUGAN, P. *et al.* Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 346–350, 2010.
- VERMA, M. L. *et al.* Microbial production of biopolymers with potential biotechnological applications. In: **Biopolymer-Based Formulations**. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 1, p. 105–137.
- VIDAL-CROS, A. *et al.* Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 3, p. 985–992, 1994.
- VINOD, A. *et al.* Renewable and sustainable biobased materials: An assessment on biofibers, biofilms, biopolymers and biocomposites. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, p. 120978, 2020.
- WANG, D. *et al.* Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 12–19, jul. 2014.
- WANG, D. *et al.* The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 325–331, 2015.
- WECKER, A.; ONKEN, U. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 3, p. 155–160, 1991.
- WEST, T. P. Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 5–6, p. 397–401, 2000.
- WEST, T. P.; REED-HAMER, B. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of

- the fungus *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, n. 3, p. 345–349, 1993.
- WEST, T. P.; STROHFUS, B. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* cells immobilized by entrapment. **Microbiological Research**, v. 153, n. 3, p. 253–256, nov. 1998.
- WEST, T. P.; STROHFUS, B. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 285–288, 2001.
- WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: **Journal of Chemical Information and Modeling**. [s.l.: s.n.]. v. 53p. 338–387.
- WU, S. *et al.* Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 645–649, maio 2009a.
- WU, S. *et al.* Downstream processing of pullulan from fermentation broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 750–753, 19 jul. 2009b.
- WU, S. *et al.* Production of pullulan from raw potato starch hydrolysates by a new strain of *Aureobasidium pullulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 740–743, jan. 2016.
- XIA, J. *et al.* Production of poly( $\beta$ -l-malic acid) by *Aureobasidium pullulans* HA-4D under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 244, n. June, p. 289–295, nov. 2017.
- XIA, Z.; WU, S.; PAN, S. Effect of two-stage controlled pH and temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1814–1816, 2011.
- XUE, S. J. *et al.* High pullulan biosynthesis from high concentration of glucose by a hyperosmotic resistant, yeast-like fungal strain isolated from a natural comb-honey. **Food Chemistry**, v. 286, n. August 2018, p. 123–128, 2019.
- YADAV, K. L.; RAHI, D. K.; SONI, S. K. An indigenous hyperproductive species of *Aureobasidium pullulans* RYLF-10: Influence of fermentation conditions on exopolysaccharide (EPS) production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1898–1908, fev. 2014.
- YU, X. *et al.* Media optimization for elevated molecular weight and mass production of pigment-free pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 928–934, jul. 2012.
- ZHANG, E. *et al.* Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 9, p. 625–632, 2011.
- ZHAO, H. M. *et al.* Variations in phthalate ester (PAE) accumulation and their formation mechanism in Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars grown on PAE-contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 95–103, 2015.
- ZHU, T. K. *et al.* Variation in metabolism and degradation of di-n-butyl phthalate (DBP) by high- and low-DBP accumulating cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) and crude enzyme extracts. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 1117–1127, 2019.
- ZOU, Y. *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin and fractions from *Auricularia auricula* fruiting bodies. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 15–21, 28 fev. 2015.
- ZURIARRAIN, A. *et al.* Quantitative determination of ethanol in cider by  $^1\text{H-NMR}$  spectrometry. **Food Control**, v. 50, p. 758–762, 2015.