



## SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MEL DO CACAU PARA PRODUÇÃO EXOPOLISSACARÍDEOS EM GLICEROL BRUTO COMO SUBSTRATO

MATEUS BARRETO FONSECA CORTES; MARCIA LUCIANA CAZETTA

### RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos são muito importantes devido às suas propriedades funcionais, com utilidade nos mais diversos setores industriais. As leveduras vêm ganhando destaque na produção de EPS, devido às elevadas produções e propriedades do seus EPS como espessantes, flocculantes, anticoagulantes, anticolesterolêmicos, entre muitas outras aplicações. Entretanto, os custos de produção ainda são elevados, tornando necessário o isolamento e estudo de produção de EPS por novas cepas isoladas do ambiente. O cacau apresenta uma microbiota rica e variada, composta principalmente de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas sendo, portanto, um bom substrato para bioprospecção microbiana. O glicerol bruto, por sua vez, sendo um subproduto da indústria de biocombustíveis produzido em grande quantidade, pode ser uma boa fonte de carbono para produção de EPS por leveduras com baixo custo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de EPS por 7 (sete) leveduras isoladas do mel cacau usando glicerol bruto a 5% como substrato. Os isolados foram cultivados em fermentação submersa, agitação de 130 rpm e  $25 \pm 2$  °C durante 96h. Após centrifugação, a biomassa foi separada do sobrenadante e utilizada para avaliação do crescimento celular por espectrofotometria (D.O.600nm). Do sobrenadante, os EPS foram precipitados com etanol absoluto em freezer durante 24 h e, em seguida, foi separado por centrifugação, seco em estufa a 80 °C até atingir peso constante e a produção foi determinada por gravimetria. Dentre os isolados, duas leveduras se destacaram na produção de EPS, a LMC07, com 1 g/L, e a LMC02, com cerca de 0,5 g/L. Os melhores crescimentos foram observados nos isolados LMC07, LMC06 e LMC02, com D.O. de 31,88, 24,68 e 17,42, respectivamente. Esses resultados demonstram um bom potencial desses isolados para produção de EPS em glicerol bruto.

**Palavras-chave:** fungos; biopolímeros; subprodutos industriais; extrato de fruta; fermentação

### 1 INTRODUÇÃO

O mel do cacau é descrito como um líquido levemente viscoso, amarelado e de sabor adocicado obtido por meio da prensagem da polpa do cacau, sendo constituído de 10 a 18 % de açúcares, 0,77% a 1,52% de ácidos não voláteis e 0,9% a 2,5% de pectina (DONATTI et al., 2021; GUIRLANDA et al., 2021).

O interesse pelo mel do cacau vem crescendo na indústria alimentícia, pois esse suco vem sendo muito utilizado na produção de néctares e bebidas, entre outros produtos. Santos et al. (2014) desenvolveram uma geleia dietética com mel do cacau que se mostrou bastante viável e com boas características sensoriais e nutricionais. Leite et al. (2019) conseguiram utilizar com sucesso o mel de cacau na produção de um fermentado alcoólico com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* AWR1726.

Há milênios o ser humano se utiliza das leveduras em processos fermentativos para produção de alimentos e bebidas, existindo relatos históricos de bebidas fermentadas na China em 7000 a.C. (MAFRA et al., 2006). Atualmente, as leveduras são utilizadas nos mais diversos

tipos de processos fermentativos, desde a produção de alimentos e bebidas até medicamentos, biocombustíveis, enzimas, pigmentos, entre muitos outros (CARVALHO et al., 2006). Isso se deve à sua alta capacidade fermentativa, versatilidade metabólica, baixo risco de contaminação ambiental e baixa nocividade à saúde humana (EL-GHWAS et al., 2021; HUY et al., 2022).

Dentre os produtos de interesse pelo mercado estão também os polissacarídeos, biopolímeros que são atrativos para setores como farmacêutico, alimentício e de cosméticos devido às suas características organolépticas e funcionais. Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos encontrados nos mais diversos organismos como plantas, animais e microrganismos, sendo formados por monômeros unidos por ligações o-glicosídicas e caracterizam 90% dos carboidratos da natureza. Os polissacarídeos microbianos sintetizados e excretados para o meio extracelular são denominados exopolissacarídeos (EPS), podendo ser solúveis e insolúveis (YLDIZ; KARATAS, 2018; CHAISUWAN et al., 2020; RANA et al., 2020).

Atualmente, os EPS produzidos por microrganismos estão sendo considerados substitutos potenciais para os polissacarídeos de origem vegetal, uma vez que é possível controlar as condições ambientais para sua produção, sem depender dos fatores climáticos naturais. Além disso, os EPS microbianos possuem características físico-químicas consideradas até superiores a gomas oriundas de fontes vegetais (ARANDA-SELVERIO et al., 2010).

Entretanto, o custo-benefício da produção microbiana de EPS ainda é desfavorável e, por isso, continua sendo importante isolar e estudar microrganismos de diferentes fontes ambientais na tentativa de encontrar cepas com elevado potencial de produção. Além disso, como forma de redução de custos, o emprego de subprodutos agroindustriais pode ser vantajoso. O glicerol, por exemplo, é um subproduto adquirido pela produção de biodiesel através do processo de transesterificação. O glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos, denominado 1,2,3-propatriol, que não possui cheiro nem cor e é levemente viscoso, podendo ser adquirido de fontes naturais ou petroquímicas, sendo comercialmente conhecido como glicerina (BEATRIZ et al., 2011).

Todavia, durante o processo de transesterificação é obtido o glicerol bruto, que possui diversas impurezas como sabão, álcoois, metanol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, sais, ésteres e metais (KUMAR et al., 2019; ADAMES et al., 2021). A purificação do glicerol bruto, especialmente para produtores de biodiesel de pequeno e médio porte, não é economicamente viável. Por isso, é importante desenvolver uma estratégia eficiente e economicamente viável de conversão do glicerol bruto em produtos com valor agregado (VIVEK et al., 2017; KUMAR et al., 2019). Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o uso do glicerol bruto como substrato para produção de EPS por leveduras isoladas do mel do cacau.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos e condições de cultivo

Foram estudadas 7 (sete) leveduras isoladas de amostras de mel do cacau adquiridas no comércio da cidade de Cruz das Almas, denominadas com os códigos LMC (Leveduras do Mel do Cacau): LMC02, LMC06, LMC07, LMC08, LMC10, LMC13 e LMC16. Os isolados foram incubados em Placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar e mantidos a  $25 \pm 2$  °C por 48 horas.

### Preparo dos meios de pré-inóculo, inóculo e fermentação

Após o crescimento em Placas de Petri, foram retiradas duas alçadas de células, transferidas para o meio de pré-inóculo e incubado a  $25 \pm 2$  °C por 24 horas. Em seguida, foram

transferidos 10% do pré-inóculo para o meio de inóculo em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 mL de meio, onde a glicose foi substituída pelo glicerol a 5%, e incubados em agitação de 130 rpm e 25 °C±2 °C por 24 horas (Tabela 1).

Para estudar a biossíntese de EPS foram transferidos 10% do inóculo para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio de fermentação com glicerol bruto a 5% (Tabela 1). Os frascos foram incubados a 130 rpm e 25 °C por 96 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 1:** Composição dos meios de cultura para produção de EPS pelas leveduras isoladas do mel do cacau.

Composição (%)	Pré-inóculo	Inóculo e Fermentação
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05	0,1
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,025	0,05
CaCl <sub>2</sub>	0,005	0,01
NaCl	0,005	0,01
Extrato de levedura	0,05	0,1
Glicose	5	-
<u>Glicerol bruto</u>	=	<u>5</u>

#### Determinação do crescimento celular

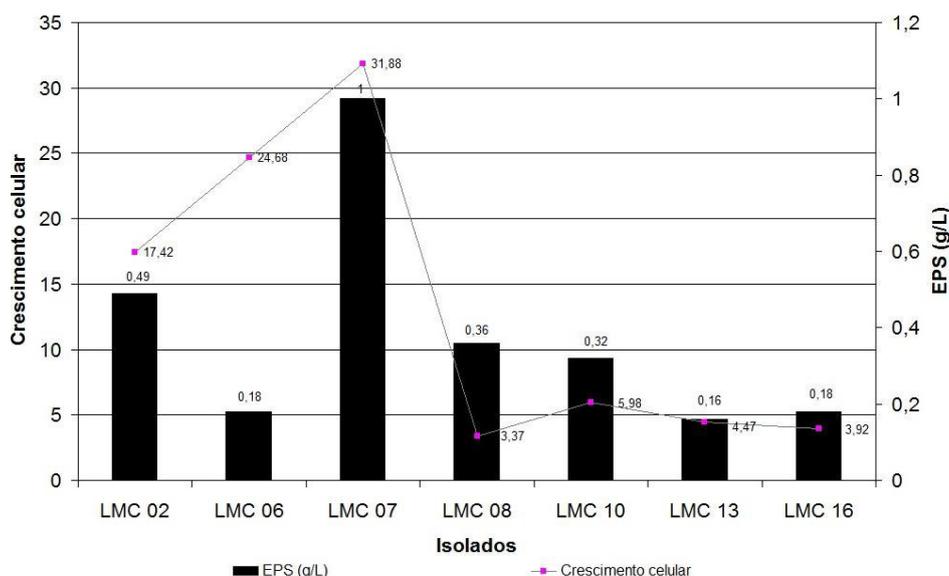
Após 96 horas de fermentação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm/ 10 °C por 20 minutos para a separação da biomassa e do sobrenadante. A biomassa foi ressuspensa em água destilada para determinação do crescimento celular por densidade ótica a 600 nm.

#### Determinação do teor de exopolissacarídeos (EPS)

Ao sobrenadante foram adicionados 25 ml de etanol absoluto (mesmo volume do meio de fermentação) e mantidos no freezer por 24 horas para separação dos EPS na forma de precipitados. Em seguida, foi feita a centrifugação a 5000 rpm e 10 °C/ 20 minutos para separação do precipitado. A produção dos EPS foi determinada por diferença de peso após secagem em estufa a 80 °C até obtenção do peso constante. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O glicerol bruto não foi um bom substrato para a produção de EPS para a maioria dos isolados, ficando abaixo de 0,4 g/L. Entretanto, dentre os 7 isolados estudados, a levedura LMC07 apresentou uma boa produção, com cerca de 1,0 g/L, seguida por LMC02, com produção de, aproximadamente, 0,5 g/L de EPS (Figura 1).



**Figura 1:** Produção de EPS (g/L) e crescimento celular (D.O.600 nm) após 96 h de cultivo em glicerol 5%, por leveduras isoladas o mel do cacau.

O isolado LMC07 também foi o que mais cresceu no meio contendo glicerol bruto a 5%, apresentando D.O. de 31,88, seguido dos isolados LMC06 e LMC02 com D.O. de 24,68 e 17,42, respectivamente (Figura 1). O isolado LMC07 apresentou, como características morfológicas, colônias de cor vermelha, bastante mucosas, o que caracteriza a presença de EPS. A cor avermelha pode indicar a presença de pigmentos carotenoides, entretanto, o EPS produzido por esta cepa apresentou cor branca, o que é um indicativo de que o pigmento é uma característica apenas da colônia.

Além da levedura LMC07, para os isolados LMC02, LMC13 e LMC16 a produção de EPS acompanhou o crescimento celular, entretanto, para os isolados LMC06, LMC08 e LMC10 o crescimento celular foi inversamente proporcional à produção de EPS. Os exopolissacarídeos são metabólitos secundários, ou seja, não são essenciais para a sobrevivência do microrganismo, sendo produzidos em condições de estresse para proteção celular, portanto, condições favoráveis para o crescimento celular são, muitas vezes, desfavoráveis para a sua síntese. O mesmo comportamento foi descrito para a levedura *Cryptococcus laurentii* SD7 em melão de cana-de-açúcar, cujo crescimento celular atingiu a fase estacionária em 48 h, mas a produção de EPS continuou se elevando até 168 h (SILVA et al., 2022).

O teor de EPS obtido pelo isolado LMC07 foi bastante expressivo quando comparado com a produção por outras leveduras. Para *Candida famata* o glicerol também foi uma boa fonte de carbono, com produção de 1,2 g/L de EPS após 96 h. Para *C. guilliermondii*, entretanto, não foi um bom substrato, produzindo apenas 0,76 g/L no mesmo período de tempo, o que representa apenas 25% da produção obtida com maltose (GIENKA et al., 2016). Ragavan et al. (2019) relataram que a levedura *Lipomyces starkei* VIT-MN03 produziu 4,87g/L de EPS, mas em condições otimizadas e utilizando de sacarose 2% como fonte de carbono. Yildiran et al. (2019) descreveram a produção de 2,6 g/L de EPS levedura *Rhodotorula glutinins* utilizando 0,1% de glicose. Entretanto, nesses trabalhos houve otimização das condições de cultivo, onde temperatura, pH, sais e, até mesmo, as fontes de carbono foram colocadas na proporção ideal para a síntese de EPS. Além disso, o glicerol é um substrato metabolicamente mais pobre do que açúcares como sacarose e glicose, indicando que o isolado LMC07 tem bom potencial para produção de EPS.

O glicerol bruto é uma fonte alternativa e de baixo custo para a produção de EPS, pois trata-se de um coproduto da produção de biocombustíveis. É um material produzido em larga

escala, uma vez que 10% da produção de biocombustíveis corresponde ao glicerol bruto, gerando grandes estoques deste material. Estima-se que em 2021 foram produzidas quase 700 mil toneladas de glicerol bruto, sendo que apenas metade desta produção foi destinada à exportação (EPE, 2022). Utilizar o glicerol bruto para processos fermentativos, além de evitar que seja descartado de forma inadequada no meio ambiente, pode agregar valor a este subproduto, fechando o ciclo da economia circular.

#### 4 CONCLUSÃO

O glicerol bruto mostrou-se um bom substrato para a produção de EPS por dois isolados de leveduras do mel do cacau, especialmente considerando-se que se trata de um subproduto do agronegócio, e não sofreu nenhum processo de purificação prévia. Das sete leveduras estudadas, quatro apresentaram bom crescimento, mostrando que o glicerol forneceu energia suficiente para o metabolismo celular e crescimento microbiano dessas cepas.

#### REFERÊNCIAS

ADAMES, L. V.; PIRES, L. P.; ADORNO, M. A. T.; MAINTINGUER, S. I. Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, jan. 2021.

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÁS, L. F.; JUNIOR, O. S.; VASCONCELOS, A. F. DALBERTO.; SILVA, M.L. C; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895–899, mar. 2020.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. DE. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estéreo-seletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, dez. 2011

CARVALHO, G. M.; BENTO, C.; SILVA, J. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª Parte – As Leveduras. **Revista Analítica**, v. 25, p. 36-42, 2006.

CHAI SUWAN, W.; JANTANASAKULWONG, K.; WANGTUEAI, S.; PHIMOLSIRIPOL, Y.; CHAIYASO, T.; TECHAPUN, C.; PHONGTHAI, S.; YOU, S.; REGENSTEIN, J.M.; EESURIYACHAN, P. Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications and bioactivities. **Food Bioscience**, v. 35, 100564, mar. 2020.

DONATTI, J. K.; SOUZA, M. V. F.; PAIXÃO M. V. S.; REZENDE, J. A; SOUZA, J. M.; SOUZA, A. H. N.; LOCATELLI, A. R; SANTOS, T. L. Aproveitamento do subproduto “Mel de Cacau” para produção de bebida alcoólica fermentada. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 57956–57970, jun. 2021.

EL-GHWAS, D.E.; ELKHATEEB, W.A.; AKRAM, M.; DABA, G.M. Yeast as biotechnological tool in food industry. **Yeast as Biotechnological Tool in Food Industry**, v. 5, n. 2, jul. 2021.

EPE-Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis-Ano 2021**. Nota Técnica. 2022, pp. 81.

GUIRLANDA, C. P.; SILVA, G. G. DA; TAKAHASHI, J. A. (2021). Caracterização, atributos e potencial de mercado do mel de cacau. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, e41410413994, abr. 2021.

GIENTKA, I.; BZDUCHA-WRÓBEL, A.; STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; BEDNARSKA, A. A.; BŁAŻEJAK, S. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, 31-37, mai. 2016.

HUY, D.T.N.; MAHMUDIONO, T.; TRUNG, N.D.; HACHEM, K.; HUSSEIN, A.R.; HAFSAN, H.; WIDJAJA, G.; BOKOV, D.; DHAMIJA, D.; KADHIM, M.M. The role of fat-producing yeasts in reducing food industry waste. **Food Science and Technology**, v. 42, e112221, dez. 2022.

KUMAR, L. R.; YELLAPU, S. L.; TYAGI, R. D.; ZHANG, X. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 293, 122155, dez. 2019.

LEITE, P. B.; MACHADO, W. M.; GUIMARÃES, A. G.; CARVALHO, G. B. M.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T. DRUZIAN, J. I. Cocoa's residual honey: physicochemical characterization and potential as a fermentative substrate by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI726. **The Scientific World Journal**, v. 2019, ID 5698089, fev. 2019.

RAGAVAN, M. L.; DAS, N. Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 515–530, fev. 2019.

RANA, S.; UPADHYAY, L.S.B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 577–583, abr. 2020.

SANTOS, C.O.; BISPO, E.S.; SANTANA, L.R.R.; CARVALHO, R.D.S. Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L) for diet jelly preparation: an alternative technology. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, p. 640- 648, set. 2014

SILVA, A.A.D., OLIVEIRA, J.M.; CAZETTA, M.L. Exopolysaccharide production by *Cryptococcus laurentii* SD7 using molasses and corn steep liquor as substrates. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**, v. 44, e58543, jul. 2022.

VIVEK, N.; SINDHU, R.; MADHAVAN, A.; ANJU, A.J.; CASTRO, E.; FARACO, V.; PANDEY, A.; BINOD, P. Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 507-517, set. 2017.

YILDIRAN, H.; BAŞYİĞİT KILIÇĞ.; KARAHAN ÇAKMAKÇI, A. G. Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. **Food Science and Technology**, 39(Suppl. 2), p. 646-653, dez. 2019.

YILDIZA, H.; NEVA KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive

properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41–46, jun. 2018.