

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA POR *Aureobasidium pullulans* CCT 1261

K. P. Rodrigues¹, M. Michelin²

1 – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900– Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6561 – e-mail: (karool.pereira06@gmail.com)

2 – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900– Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6959 – e-mail: (michelonmariano@gmail.com)

RESUMO. *Aureobasidium pullulans* é uma levedura conhecida por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos, como o exopolissacarídeo pululana. A pululana, um biopolímero natural com características biodegradáveis e biocompatíveis, pode ser aplicada em diversos setores industriais, ademais, possui propriedades de interesse para aplicação na formação de matrizes de encapsulação. O presente trabalho teve como objetivo iniciar a avaliação da produção de pululana pelo *A. pullulans* CCT 1261. Como resultados, obtivemos a concentração máxima de biomassa ($12,78 \pm 0,73$ g/L) e pululana ($4,82 \pm 0,85$ g/L), obtidas em 48 e 72 h, respectivamente. A pululana produzida apresentou coloração branca até 48 h de cultivo, porém, tempos prolongados levaram ao escurecimento do biopolímero, sugerindo possível produção de melanina. Os resultados mostraram-se promissores, demonstrando o potencial da linhagem para a produção de pululana, no entanto, são necessários estudos adicionais para maximizar as condições de cultivo e evitar a interferência de pigmentos na pureza do biopolímero.

ABSTRACT. *Aureobasidium pullulans* is a yeast known for its ability to produce bioactive metabolites, such as the exopolysaccharide pullulan and several enzymes. Pullulan, a natural biopolymer with biodegradable and biocompatible characteristics, can be applied in several industrial sectors and has properties of interest for application in the formation of encapsulation matrices. The present study aimed to begin the evaluation of pullulan production by *A. pullulans* CCT 1261. As results, we obtained the maximum concentration of biomass (12.78 ± 0.73 g/L) and pullulan (4.82 ± 0.85 g/L), obtained in 48 and 72 h, respectively. The pullulan produced was white in color for up to 48 h of cultivation, however, prolonged cultivation times led to darkening of the biopolymer, suggesting possible melanin production. The results were promising, demonstrating the strain's potential for pullulan production. However, additional studies are needed to improve cultivation conditions and avoid pigment interference in the purity of the biopolymer.

PALAVRAS-CHAVE: biopolímero; fungo filamentoso; levedura negra.

KEYWORDS: biopolymer; filamentous fungus; black yeast.



1. INTRODUÇÃO

Aureobasidium pullulans é um fungo filamentosso, amplamente estudado por suas propriedades biotecnológicas e industriais (Hamidi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). *A. pullulans* pode ser cultivado em meios contendo diferentes fontes de carbono, como sacarose e glicose, que não só favorecem o crescimento do microrganismo, mas também estimulam a produção de substâncias de interesse biotecnológico, como biopolímeros (Singh *et al.*, 2017). Morfológica e fenotipicamente, *A. pullulans* apresenta uma estrutura de crescimento micelial, com hifas septadas e ramificadas, formando colônias que inicialmente são brancas, mas que podem escurecer para tons de marrom ou preto à medida que envelhecem. O escurecimento das colônias ocorre devido à produção de melanina, o que a torna conhecida como levedura negra (Cheng, Demirci e Catchmark, 2011).

O exopolissacarídeo pululana, produzido pelo *A. pullulans*, é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de maltotriose conectadas por ligações glicosídicas α -(1→6), o que lhe confere propriedades como solubilidade em água, biodegradabilidade e impermeabilidade ao oxigênio. Devido as suas propriedades físico-químicas e biológicas específicas, é de interesse para uma variedade de aplicações, especialmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biomédica (Hamidi *et al.*, 2019; Oktay, Bozdemir e Özbaş, 2022). Além disso, por ser considerado um composto GRAS (*Generally Recognized as Safe*), a pululana pode ser utilizada na formulação de alimentos funcionais, apresentando potencial prebiótico devido à sua baixa metabolização pelo organismo humano (Mirzaee *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2017). Diante do potencial biotecnológico da pululana e da influência das condições de cultivo em sua produção, o presente trabalho teve como objetivo iniciar a avaliação da produção de pululana pelo *A. pullulans* CCT 1261.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção do Micro-organismo e Preparo do Pré-inóculo e do Inóculo

A levedura *A. pullulans* var. *melanogenum* CCT 1261 foi cultivada em ágar batata dextrose (PDA) a 24 °C por 72 h e subcultivadas a cada mês. Para o preparo do pré-inóculo, uma alça de células de levedura foi transferida para tubos contendo 5 mL de meio estéril (pH 6,5) composto de (g/L): glicose (50), extrato de levedura (2,5), KH_2PO_4 (5) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,6), NaCl (1) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2) em pH 6,5 (An *et al.*, 2017). Os tubos foram incubados a 28°C durante 24 h. Para o crescimento do inóculo, o volume correspondente ao pré-inóculo (5 mL) foi transferido para *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 45 mL do mesmo meio estéril e mantido a 28°C e 230 rpm (agitação orbital) durante 24 h. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 min e a solução de glicose e de xilose esterilizadas por filtração através de membrana de acetato de celulose de 0,22 μm (Millipore, Estados Unidos).



2.2 Produção de Pululana

A produção do exopolissacarídeo pululana foi realizada em cultivo submerso em frascos *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 50 mL do meio estéril. Para isso, foi realizado um cultivo utilizando a glicose como fonte de carbono. O meio foi composto por (g/L): glicose (50), extrato de levedura (2,5), KH_2PO_4 (5) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,6), NaCl (1) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 6,5 (An *et al.*, 2017). Após a esterilização (121°C por 15 min), os frascos foram inoculados com 5% (v/v) do inóculo e mantidos a 28°C e 230 rpm durante 144 h. O crescimento de biomassa e a produção de pululana foram avaliados a cada 24h.

2.3 Determinações Analíticas

A concentração de biomassa (g/L) foi estimada pela medida da densidade óptica a 620 nm a partir da curva de calibração de biomassa seca. Para a construção da curva, o meio de cultivo foi centrifugado (4757x g, 30 min, 4°C), e a biomassa lavada e ressuspensa em água destilada para a leitura da absorbância. Posteriormente, a biomassa foi seca à 105°C até massa constante (Galiotou-Panayotou, Kalantzi e Aggelis, 1998). A concentração de açúcares redutores foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital de acordo com a AOAC n° 972.44 (AOAC, 2000).

2.4 Purificação e Quantificação da Pululana

Para a purificação e quantificação da pululana, inicialmente o meio de cultivo foi centrifugado para remoção da biomassa, e posteriormente, 15 mL do sobrenadante foram transferidos e 30 mL de etanol frio adicionados e misturados completamente. A mistura foi mantida a 4°C por 24 h para precipitar os polissacarídeos extracelulares. Posteriormente, o precipitado foi seco 80°C até peso constante. O conteúdo de pululana foi expresso em g/L (Marvdashti *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os parâmetros cinéticos avaliados durante a produção do exopolissacarídeo pululana utilizando *A. pullulans* CCT 1261. A concentração máxima de biomassa ($12,78 \pm 0,73$ g/L) foi alcançada em 48 h de cultivo (Figura 1.a), após este período, a levedura manteve-se na fase estacionária de crescimento, não atingindo a fase de declínio até as 144 h de cultivo. Quanto a concentração máxima de pululana ($4,82 \pm 0,85$ g/L) ocorreu em 72 h (Figura 1.c),



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

indicando que a produção do exopolissacarídeo acompanha o crescimento da levedura, mas pode continuar mesmo após a fase exponencial de crescimento.

Após 72 h de cultivo, houve redução na concentração do biopolímero, possivelmente devido à menor disponibilidade de substrato (glicose) no meio de cultivo (Figura 1.d), além da redução do pH (Figura 1.b) (Marvdashti *et al.*, 2018). A limitação da fonte de carbono pode levar o microrganismo a reutilizar biopolímeros como fonte de energia alternativa, especialmente sob condições adversas. Vale destacar que, além de poder atuar como reserva de carbono, os biopolímeros desempenham papel importante na proteção da célula contra estresses ambientais, como variações osmóticas e desidratação (Prasad e Purohit, 2023; Salimi e Farrokh, 2023).

Cheng, Demirci e Catchmark (2011) destacam que apesar da produção de pululana em larga escala já estar estabelecida, um dos principais desafios ainda é a coloração indesejada do polissacarídeo, resultante da síntese concomitante de melanina, produção relacionada a mecanismos de proteção contra estresses ambientais. No entanto, conforme apresenta Figura 2, a pululana produzida pelo *A. pullulans* CCT 1261, apresentou coloração branca, sem pigmento, até as 48 h de cultivo, período em que o microrganismo apresentou fase exponencial de crescimento. Após este período, o biopolímero apresentou colorações mais escuras de acordo com o decorrer do tempo, o que pode estar relacionado a diversos fatores, como por exemplo, a baixa concentração de substrato e a queda do pH, além da produção de pigmentos, incluindo melanina.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de pululana por *A. pullulans* CCT 1261 acompanha o crescimento celular e é influenciada por fatores como disponibilidade de substrato e variações no pH. Dessa forma, a coloração do biopolímero pode estar associada a mecanismos de resposta do microrganismo a condições de cultivo, o que reforça a importância de otimizações para minimizar a síntese de pigmentos indesejáveis. Esses resultados fornecem informações relevantes para novas investigações específicas à melhoria da produção e purificação da pululana para aplicações industriais.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Figura 1 – (a) Concentração de biomassa (g/L); (b) pH; (c) Concentração de glicose (g/L); (d) Concentração de pululana (g/L).

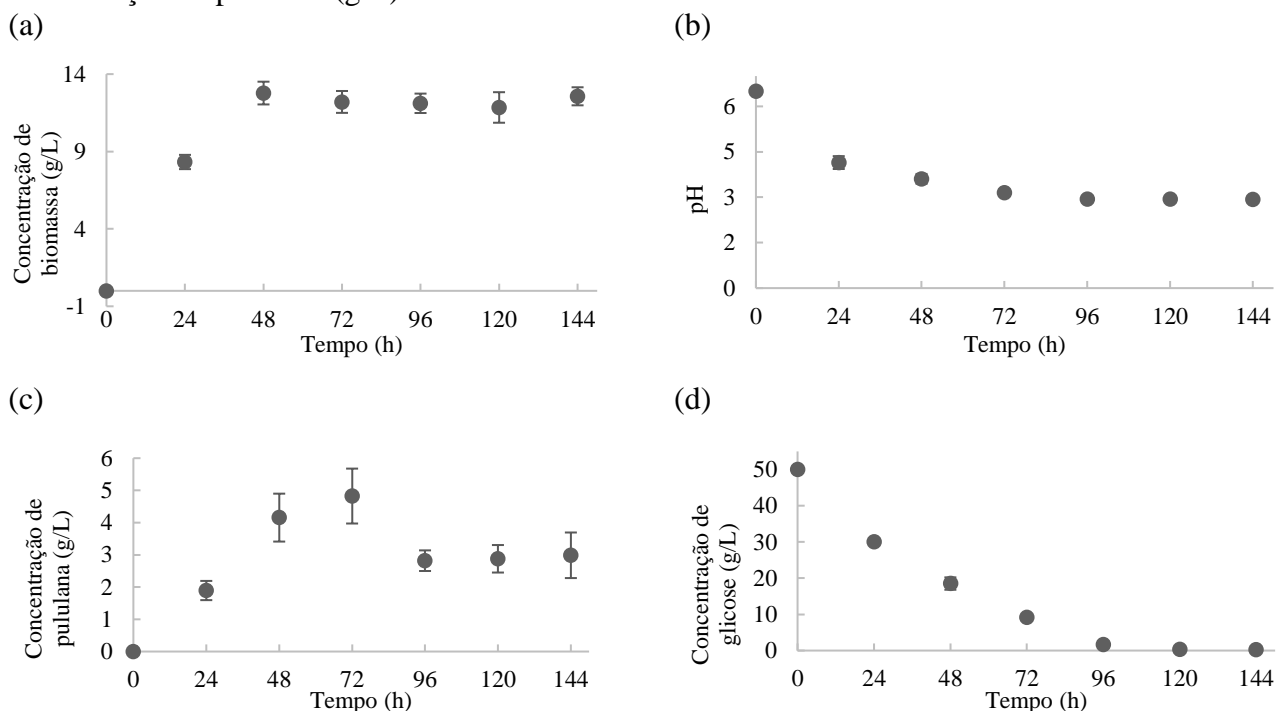
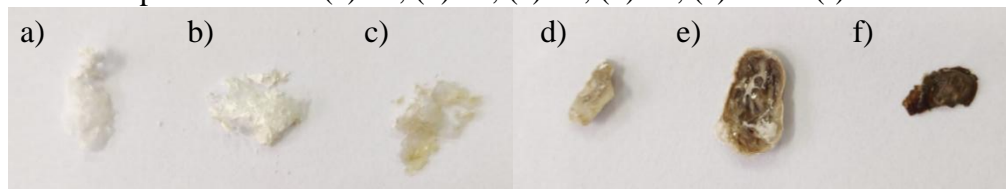


Figura 2 – Pululana produzida em (a) 24, (b) 48, (c) 72, (d) 96, (e) 120 e (f) 144 h.



4. CONCLUSÕES

A produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 mostrou-se viável, sendo influenciada por fatores como disponibilidade de carbono e variações no pH. A caracterização do processo evidenciou que a coloração do biopolímero pode ser impactada por condições ambientais, ressaltando a necessidade de otimizações para aplicações industriais. Além disso, a otimização das condições de cultivo pode ser uma estratégia importante para maximizar a produção e a pureza da pululana, além de reduzir a interferência de pigmentos indesejáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, C., MA, S. JIAN, CHANG, F., & XUE, W. JIAO. 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, 2017.



AOAC. *Official Methods of Analysis of International*. Arlington, 2000.

CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 29–44, 2011.

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

HAMIDI, M., KENNEDY, J. F., KHODAIYAN, F., MOUSAVI, Z., & HOSSEINI, S. S. 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.

MARVDASHTI, L. M., ABDOLSHAHI, A., HEDAYATI, S., SHARIFI-RAD, M., IRITI, M., SALEHI, B., & SHARIFI-RAD, J. Pullulan gum production from low-quality fig syrup using *Aureobasidium pullulans*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 8, p. 22–26, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIRZAEI, H., KHODAIYAN, F., KENNEDY, J. F., & HOSSEINI, S. S. Production, optimization and characterization of pullulan from sesame seed oil cake as a new substrate by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 1, 2020.

OKTAY, B. A.; BOZDEMIR, M. T.; ÖZBAŞ, Z. Y. Evaluation of some agro-Industrial wastes as fermentation medium for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* AZ-6. **Current Microbiology**, v. 79, n. 3, 2022.

PRASAD, S.; PUROHIT, S. R. Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, 1 jul. 2023.

SALIMI, F.; FARROKH, P. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, 2023.

SINGH, R. S., KAUR, N., RANA, V., & KENNEDY, J. F. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 102–121, 2017.

WANG, P., JIA, S. L., LIU, G. L., CHI, Z., & CHI, Z. M. *Aureobasidium* spp. and their applications in biotechnology. **Process Biochemistry**, v. 116, p. 72–83, 2022.

WU, S., JIN, Z., TONG, Q., & CHEN, H. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 645–649, 2009.