
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Yara Cristina Bueno

Biomassa do fungo filamentosso *Lasiodiplodia theobromae*: Composição química e utilização como nutriente para bioprocessos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro – SP

Abril - 2016

Yara Cristina Bueno

Biomassa do fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*: Composição química e utilização como nutriente para bioprocessos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Dr^a. Valéria Marta Gomes do Nascimento

Rio Claro

Abril/2016

589.2 Bueno, Yara Cristina
B928b Biomassa do fungo filamentoso Lasiodiplodia
theobromae : composição química e utilização como nutriente
para bioprocesso / Yara Cristina Bueno. - Rio Claro, 2016
58 f. : il., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Valéria Marta Gomes do Nascimento

1. Fungos. 2. Exopolissacarídeo. 3. Viabilidade
econômica. 4. Capacidade nutricional. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Biomassa do fungo filamentosso *Lasiodiplodia theobromae*: Composição química e utilização como nutriente para bioprocessso

AUTORA: YARA CRISTINA BUENO

ORIENTADORA: VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO
Faculdade de Ciências e Letras de Assis / Faculdade de Ciências e Letras de Assis



Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Unesp Araraquara

Rio Claro, 04 de abril de 2016

Dedico este trabalho à
minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, pela confiança em meu trabalho e por compartilhar comigo as suas ideias, conhecimentos, tempo e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Dra. Lucimara Cordeiro, pela identificação do material produzido neste trabalho.

À UNESP, pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao Bruno, pela paciência, pelas boas ideias, por quebrar um milhão de galhos e, sobretudo, pela parceria e amizade.

À equipe do LBBIO, pela companhia, risadas e cantorias. Em especial, à Paula Zardetto e à Olívia Dias, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas Kassandra, Mirela, Ana, Natashi e Regiane, pela constante presença e pelas conversas esclarecedoras.

À Júlia, por me oferecer café da tarde, depois de um cansativo (e nem sempre produtivo) dia no laboratório.

À minha querida Fabi, que apoiou meus planos, opinou em minhas dúvidas e compartilhou comigo as minhas ânsias, frustrações e “ideias geniais”, acompanhando-me sempre com muita compreensão e doçura.

Aos meus pais, Isabel e Virgolino, e à minha irmã, Franciele, que investiram tempo, dinheiro, confiança e, sobretudo, muito carinho em meu desenvolvimento pessoal e acadêmico. Devo a eles cada letra aqui registrada.

“É preciso força para sonhar e
perceber que a estrada vai além do
que se vê”. (Marcelo Camelo)

RESUMO

A riqueza nutricional da biomassa de *Lasiosiplodia theobromae*, resíduo do bioprocesso que tem como finalidade a produção de exopolissacarídeo (EPS), foi estudada neste trabalho, bem como a produção de EPS pelo mesmo fungo, em cultivos suplementados com esse biomaterial. Inicialmente, o microrganismo foi cultivado em condição padrão (sacarose 50 g/L, sais mínimos de Vogel (SMV) e nitrato de amônio 2 g/L, 28 °C, 72 h), e o EPS e a biomassa (Biomassa A), provenientes deste cultivo, foram separados e quantificados por gravimetria. Parte da biomassa foi lavada, por duas vezes, com solução de NaCl 0,15 mol/L, autoclavada, liofilizada, tamisada e analisada quanto à composição bromatológica (Weende e Kjeldahl) e de minerais (Absorção Atômica), e utilizada como suplemento aos meios de cultivo. A biomassa A apresentou 332 g/kg de C e 51 g/kg de N, além de sais minerais, como Zn, Fe, Cu, Mn, K, Mg, Ca, S e P. Para avaliar a adição de biomassa em meio de cultivo para produção de EPS, foram realizados 18 experimentos, com 6 diferentes composições (meios BSVN, BSV, BVN, BV, BN e B), identificados de acordo com a composição de nutrientes: Biomassa A 20, 40 ou 60 g/L (B), sacarose 50 g/L (S), SMV (V) e nitrato de amônio 2 g/L (N). Houve produção de EPS em 16 experimentos, sendo que em apenas três condições experimentais a produção de EPS foi inferior à condição padrão de cultivo. Destaque para os resultados obtidos em meios BV, compostos por biomassa 40 e 60 g/L e SMV, sendo 3,22 e 3,99 g/L de EPS, respectivamente, enquanto que na condição padrão de cultivo, houve produção de 1,3 g/L de EPS. A biomassa resultante do primeiro cultivo com adição de Biomassa A, identificada como Biomassa B (Biomassa A residual + biomassa de novo crescimento microbiano), também foi avaliada quanto à composição bromatológica e de minerais. Observou-se 414 g/kg de C e 46 g/kg de N. Cultivos na condição BV com 40g/L de biomassa foram realizados em ciclos subsequentes, a fim de se verificar por quantos cultivos a biomassa poderia ser utilizada para a produção de EPS pelo fungo. Observou-se produção de EPS até o 3º ciclo, obtendo-se 2,1, 1,4 e 1,1 g/L, entre o 1º e o 3º ciclos, respectivamente, enquanto que, na condição padrão de cultivo, foram obtidos 1,4 g/L de EPS. O EPS produzido em meio BV foi caracterizado estruturalmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), após fracionamento por gelo e degelo. Observou-se a presença de uma β -glucana-(1→3)-(1→6) insolúvel em água fria, e uma β -glucana-(1→6), solúvel em água fria. Os resultados confirmam a possibilidade de utilização de biomassa de *L. theobromae* como suplemento para meios de cultivo.

Palavras chave: Biomassa fúngica, exopolissacarídeo, viabilidade econômica, capacidade nutricional.

ABSTRACT

The nutritional value of *Lasiodiplodia theobromae*' biomass, waste of the bioprocess used for the production of exopolysaccharide (EPS) was studied in this work, as well as the production of EPS by the same fungus when grown in cultures supplemented with this biomaterial. Initially the microorganism was cultured in standard conditions (Sucrose 50 g/L, Vogel minimal salts (SMV) and ammonium nitrate 2 g/L, 28 °C, 72 h) and the EPS and the biomass (A Biomass) from this culture were separated and quantified by gravimetry. Part of the biomass was rinsed twice with NaCl 0.15 mol/L solution, autoclaved, lyophilized, sieved and analyzed for chemical composition (Weende and Kjeldahl) and minerals (Atomic Absorption) and used as a supplement to culture medium. Biomass A presented 332 g/kg C and 51 g/kg of N, and minerals such as Zn, Fe, Cu, Mn, Mg, Ca, S and P. In order to evaluate the addition of biomass in the culture medium for EPS production, 18 experiments were conducted with six different compositions (BSVN, BSV, BVN, BV, BN and B growth mediums), identified accordingly to the nutritional components: A Biomass 20, 40 or 60 g/L (B), Sucrose 50 g/L (S), SMV (V) and ammonium nitrate 2 g/L (N). EPS production occurred in 16 experiments, and in only three experimental conditions EPS production was lower than on the standard cultivation condition. Emphasis to the results obtained in BV medium, composed by biomass 40 and 60 g / L and SMV, being 3.22 and 3.99 g/L EPS, respectively, while the standard conditions of cultivation, production occurred of 1.3 g/L EPS. The biomass resulting this first cultivation with addition of A Biomass, identified as B Biomass (A Biomass waste + the biomass new microbial growth) was also evaluated for their chemical and mineral composition. As result 414 g/kg C and 46 g/kg N. Cultivations on BV condition with 40g/L of biomass were carried out in subsequent cycles, in order to check for how many cultivations the same biomass could be used in other to enable the fungus to produce EPS. It was observed EPS production until the 3rd cycle, producing 2.1, 1.4 and 1.1 g/L, respectively, while the standard cultivation condition produced 1.4 g/L EPS. The EPS produced in BV medium was structurally characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), after fractionation by freezing and thawing. It was observed the presence of a β -(1 \rightarrow 3) - (1 \rightarrow 6)-glucan, insoluble in cold water, and a β -(1 \rightarrow 6)-glucan, soluble in cold water. The results confirm the possibility of use of *L. theobromae* biomass as supplement for culture mediums.

Keywords: Fungi biomass, exopolysaccharide, economic viability, nutritional capacity.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	12
2. ESTADO DA ARTE	13
2.1 A utilização de microrganismos em processos industriais e seus desafios.....	13
2.2 Utilização de biomassa residual, proveniente de bioprocessos industriais	14
2.3 O extrato de levedura.....	15
2.4 Exopolissacarídeos.....	16
2.5 O fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	17
2.6 Exopolissacarídeo de <i>L. theobromae</i>	17
2.7 Sustentabilidade em bioprocessos.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Microrganismo.....	19
4.2 Produção de EPS em condição padrão.....	20
4.2.1 Obtenção do inóculo.....	20
4.2.2 Produção de EPS em condição padrão.....	20
4.3. Tratamentos da Biomassa utilização como suplemento ao meio de cultivo.....	20
4.3.1 Biomassa liofilizada.....	20
4.4 Produção de EPS utilizando biomassa liofilizada como suplemento de meio de Cultivo.....	21
4.4.1 Estudo de composição de meio de cultivo.....	22
4.5 Utilização de biomassa em cultivos subsequentes.....	22
4.6 Métodos analíticos.....	23
4.6.1 Análises de açúcares.....	23
4.6.2 Análise de amônio.....	23
4.6.3 Análise de nitrogênio α amino.....	23
4.6.4 Análise de proteínas.....	23
4.6.5 Análise bromatológica e de minerais.....	24
4.6.6 Separação dos diferentes EPS de <i>L. theobromae</i> pelo método de congelamento e degelo.....	24

4.6.7 Caracterização estrutural, por ressonância Magnética Nuclear (RMN), do EPS de <i>L. theobromae</i> , produzido em cultivos suplementados com Biomassa A.....	25
4.6.8 Quantificação de EPS residual das biomassas obtidas nos cultivos.....	25
4.7 Análise de resultados.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Produção de EPS em condição padrão.....	25
5.2 Composição nutricional da biomassa A após cultivo em condição padrão.....	27
5.3 Produção de EPS utilizando Biomassa A: influência de diferentes concentrações de biomassa, adição de sacarose, nitrato de amônio e sais mínimos de Vogel.....	32
5.3.1 Adição de biomassa.....	32
5.3.2 Adição de sacarose.....	33
5.3.3 Adição de nitrato de amônio.....	35
5.3.4 Adição de sais mínimos de Vogel.....	36
5.4 Utilização da biomassa em ciclos repetidos, em meio de cultivo BV, para a produção de EPS por <i>L. theobromae</i>	39
5.5 Caracterização estrutural do EPS obtidos nos cultivos em meio BV.....	45
6. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

Fermentação microbiana é o método utilizado para a produção comercial de diversos produtos de interesse industrial, comercializados em alta quantidade. A fermentação alcoólica de bebidas, praticada no antigo Egito, e a produção de pães, que remonta aos tempos bíblicos, são exemplos de que a exploração dos microrganismos não é evento recente. Entretanto, o uso da fermentação de microrganismos, especialmente de fungos filamentosos, tem se intensificado nos últimos cinquenta anos (PAPAGIANNI, 2004). Recursos microbianos têm gerado benefícios na forma de produtos fermentados, antibióticos, aditivos e outros serviços essenciais (SONIA et al., 2014). Tais produtos, em sua maioria, são sintetizados durante a fase estacionária do desenvolvimento microbiano (PAPAGIANNI, 2004).

Entretanto, para a obtenção do produto de interesse, geralmente há elevado crescimento micelial, culminando em elevada quantidade de biomassa, o que não é favorável ao bioprocessamento, pois gera acúmulo de resíduos. Assim, a destinação adequada da biomassa micelial gerada em bioprocessamento é fundamental, seja por necessidades ambientais ou como alternativa para a diminuição dos custos de cultivo.

Dentre os produtos de interesse produzidos por microrganismos estão os polissacarídeos.

Polissacarídeos são polímeros formados por unidades monossacarídicas. Podem ser encontrados em vegetais, algas, bactérias e fungos, integrando sua parede celular, ou podem ser produzidos no meio extracelular. Estes são denominados exopolissacarídeo (EPS).

Devido à facilidade de obtenção e separação, os EPS são bastante atrativos, tanto do ponto de vista científico quanto industrial. A produção de EPS microbianos não é afetada por alterações climáticas, contaminação marinha ou problemas nas colheitas, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais, extraídas de vegetais.

A maior parte dos polissacarídeos produzidos por fungos são do tipo β -glucanas. β -glucanas são compostos bioativos, conhecidos por apresentarem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, além de apresentarem propriedades físicas importantes à indústria, como viscosidade, gelificação e solubilidade em água (ZHU et al., 2016). Alguns estudos trazem aplicações para β -glucanas fúngicas. DENG et al. (2012) demonstraram, *in vitro*, a atividade antioxidante de uma β -D-glucana secretada pelo fungo basidiomiceto *Dictyophora indusiata*. Uma glucana do tipo β -(1 \rightarrow 6) ramificada em (1 \rightarrow 3), isolada do fungo *Schizophyllum commune*, foi descrita por PARK et al. (2001) como um ingrediente com potencial para impedir o envelhecimento da pele, além de promover a biossíntese de células epiteliais e de colágeno. Ainda para os benefícios da pele, a β -glucana secretada pelo fungo *Schizophyllum commune*, quando aplicada

externamente, foi capaz de hidratar a pele em caso de doenças utópicas e reduzir o prurido, quando acometida por infecções bacterianas (KIM et al., 2008).

Lasiodiplodia theobromae é um fungo filamentosso produtor de EPS, composto por três cadeias: uma β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), insolúvel em água fria, e duas glucanas β -(1 \rightarrow 6). Este EPS tem apresentado propriedades medicinais importantes, além da capacidade de formar filmes plásticos. Entretanto, condições de produção economicamente viáveis, assim como processos ecologicamente corretos, são pré-requisitos essenciais à implantação comercial do EPS de *L. theobromae*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biomassa de *L. theobromae*, em relação à composição química e a utilização como nutriente em meio de cultivo para produção de EPS, visando tanto a obtenção de matéria prima de baixo custo que possa ser utilizado em fermentações industriais, quanto o desenvolvimento de bioprocessos de acordo com os novos conceitos de ecologia e sustentabilidade industrial.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 A utilização de microrganismos em processos industriais e seus desafios

Microrganismos são importantes ferramentas industriais, devido à sua capacidade de crescer em substratos simples e gerar biomateriais comercialmente interessantes à indústria de bioprocessos (MITCHELL, et al., 1992; WUCHERPFENNIG; LAKOWITZ; KRULL, 2013). O uso da fermentação de fungos filamentosos tem se intensificado nos últimos cinquenta anos (PAPAGIANNI, 2004). Atualmente, é a metodologia utilizada para a produção comercial, em grande volume, de diversos produtos biotecnológicos (GAVRILESCU; CHISTI, 2005), devido à sua diversidade metabólica, capacidade de produção elevada, eficiência de secreção e capacidade de realizar modificações pós-traducionais. Fungos filamentosos têm sido amplamente explorados na produção de substâncias bioativas, proteínas naturais ou heterólogas (KRULL et al., 2013), antibióticos e aditivos (SONIA et al., 2014). Tais produtos, denominados metabólitos secundários, são, geralmente, sintetizados no final do crescimento microbiano, ao entrar na fase estacionária (PAPAGIANNI, 2004).

A indústria farmoquímica e biotecnológica estão entre as que mais se utilizam da fermentação microbiana para a obtenção de produtos, tais como bioetanol (26000000 toneladas/ano), antibióticos (35000 toneladas/ano), xantana (EPS) (30000 toneladas/ano), dextrana (200 toneladas/ano), enzimas alimentares (20000 toneladas/ano) (GAVRILESCU; CHISTI, 2005), entre outros. Entretanto, os altos custos para a obtenção de produtos de interesse produzidos por

fungos filamentosos e a destinação de resíduos, visando evitar danos ambientais, são desafios a serem enfrentados.

O alto custo para a produção de metabólitos se dá, principalmente, pela relação de produção de metabólitos *versus* crescimento microbiano. Para bactérias e leveduras, essa relação está bem estabelecida. Segundo UMASHANKAR et al. (1996), para uma concentração de 2,5 g/L de goma xantana, o crescimento celular é de 3,5 g/L, mostrando que a bactéria consegue associar crescimento e produção de EPS. Em estudo realizado por CHI et al. (2009), foi evidenciado que a produção de pululana está intimamente associada ao crescimento da levedura *Aureobasidium pullulans*. Para fungos filamentosos não há um padrão estabelecido, mas nota-se que a maior parte dos nutrientes são metabolizados para a manutenção celular e não para a produção de metabólitos secundários. Para a produção de penicilinas pelo fungo filamentoso *Penicillium* sp., cerca de 65% do carbono é metabolizado para manutenção celular, 20-25% para crescimento celular e 10-12% para produção de penicilina, que é o produto de interesse (VAN NISTELROOIJ, 1998). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, no cultivo do fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*, foram obtidos cerca de 24,3 g/L de biomassa, para a produção de 2,5 g/L de exopolissacarídeo (OLIVEIRA et al., 2015), a partir de 50 g/L de sacarose.

A elevada produção de biomassa em processos industriais torna imprescindível sua destinação apropriada.

2. 2 Utilização de biomassa residual, proveniente de bioprocessos industriais

A destinação da biomassa proveniente do crescimento celular é assunto relevante no desenvolvimento de um bioprocessos, não só para a diminuição de custos, mas também por questões ambientais. Bioprocessos industriais têm incluído questões ambientais sob diferentes aspectos, tanto na utilização de resíduos em geral, como componentes de meio de cultivo, quanto da destinação e reutilização dos resíduos do próprio bioprocessos. É possível encontrar na literatura a aplicação de biomassa fúngica como ração animal ou produção de fertilizantes, como por exemplo, a biomassa de *Penicillium chrysogenum*, após produção de antibióticos, citada por MUZZARELLI et al. (2000). CAVKA et al. (2011) cita a utilização de resíduos industriais de baixo ou nenhum valor comercial como fonte de nutrientes para microrganismos produtores de enzimas. Biomassa fúngica também tem sido explorada para biossorção de chumbo contaminante em efluentes (LO et al., 1999). Na indústria de lacase, técnicas que utilizem substratos de crescimento baratos, tais como resíduos agrícolas e alimentares ou de águas residuais e, ainda, da indústria de celulose, têm sido testadas para baratear a produção e diminuir a poluição ambiental, e vêm alcançando resultados positivos para a diminuição de custos (OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2011).

NORONHA et al. (2000) constataram que ao suplementar o meio de cultivo para *Trichoderma harzianum* com parede celular fúngica de *Pythium sp.*, houve produção aumentada de β -glucanases, cerca de 10,8 U/mL. A biomassa de *Anacystis nidulans* foi utilizada por MISHRA e KUMAR (2007), visando a obtenção de lacases em meio sólido, por *Pleurotus ostreatus*. Neste trabalho, o meio de cultivo contendo casca de amendoim foi suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, extrato de levedura e biomassa seca da cianobactéria). Os autores obtiveram 49,21 U/g de atividade de lacase, quando utilizaram a biomassa seca da cianobactéria, superior ao obtido com meio contendo extrato de levedura (23,32 U/g) ou sem adição de suplemento (2,2 U/g).

2.3 O extrato de levedura

A utilização comercial mais difundida de biomassa é a produção de extrato de levedura de *Saccharomyces sp.*, uma levedura amplamente utilizada em processos industriais, como na indústria de panificação e sucroalcooleira, nas quais é subproduto. Segundo a União dos Produtores de Bioenergia, em 2013 a produção de álcool no Brasil foi de cerca de 23.473, 354 L. Se a produção de cada litro de álcool rende cerca de 40g de levedura seca (CARVALHO, 2010), a produção anual de levedura na indústria de produção de álcool gira em torno de 939 ton/ano. Esses excedentes de células de levedura têm sido utilizados na alimentação animal e na formulação de produtos para humanos, como suplemento nutritivo e flavorizante (YAMADA et al., 2003), além de sua utilização na indústria de alimentos processados (OTERO; VINCENZINI, 2003). A exploração comercial do extrato de levedura se dá devido ao seu alto teor de enzimas, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos e lipídios, constituintes de alto valor agregado (BELEM; LEE, 1998). Por apresentar tais características, a adição de extrato de levedura aos meios de cultivo microbianos é prática comum, embora o custo nem sempre seja viável.

Para a suplementação de meios de cultivo microbianos, é comumente utilizada a levedura de panificação ou a biomassa residual da levedura de cerveja hidrolisada ou autolisada (FERREIRA et al., 2010). A utilização da levedura de panificação encarece os custos de produção microbiano, mas o uso do subproduto de cervejarias é vantajoso, pois, por ser resíduo de um bioprocessos, torna sua utilização economicamente viável.

O extrato de levedura pode ser obtido por autólise, plasmólise ou hidrólise. A autólise por enzimas endógenas ocorre naturalmente, logo que o microrganismo entra em fase de morte. Neste processo, enzimas intracelulares promovem a quebra de constituintes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos e glicogênios, liberando-os no meio extracelular. No processo de plasmólise são utilizados sais inorgânicos, como cloreto de sódio ou solventes orgânicos não

polares, para que a autólise seja acelerada (FERREIRA et al., 2010). A hidrólise consiste na utilização de ácido clorídrico ou enzimas proteolíticas, para que ocorra o rompimento da célula e extravasamento do conteúdo celular (CHAE; JOO; IN, 2001).

2.4 Exopolissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas compostas por monossacarídeos e são produzidos tanto por eucariotos, como algas marinhas e vegetais, quanto procariotos. Podem ser intracelulares, quando integram a parede celular, ou extracelulares, neste caso, denominados exopolissacarídeo (FARIA, 2002). Os polissacarídeos produzidos por microrganismos podem ser classificados em três grupos principais, de acordo com sua localização na célula: polissacarídeos citosólicos, que fornecem carbono como fonte de energia para a célula, polissacarídeos que formam a parede da célula, incluindo peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, e os exopolissacarídeos, polissacarídeos que são exsudados no meio extracelular como cápsulas ou biofilme (DONOT et al., 2012).

Os EPS de origem microbiana, também chamados de biopolímeros, têm sido objeto de intensa pesquisa porque, além de apresentarem propriedades similares ou superiores aos tradicionalmente empregados na indústria (de origem vegetal e algas marinhas) são, muitas vezes, capazes de formar soluções viscosas. Alguns deles também formam géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, podendo ser utilizados como substratos para desenvolvimento de novos produtos, por exemplo, após uma derivatização química (CORRADI DA SILVA et al., 2006; ZHANG et al., 2000).

Em relação aos polissacarídeos de origem vegetal, a utilização de polissacarídeos microbianos apresenta algumas vantagens. A produção de EPS microbianos não é afetada por alterações climáticas, contaminação marinha ou problemas nas colheitas, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais (SEVIOUR et al., 1992). São, ainda, menos susceptíveis à variabilidade em suas propriedades químicas e físicas, mantendo o padrão de qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Além disso, sua recuperação e purificação apresentam dificuldades menores, comparadas aos vegetais, como também existem técnicas de genética molecular que permitem obter polissacarídeos microbianos com propriedades específicas, as quais ainda não são possíveis nos vegetais (SELBMAN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002).

A goma xantana, uma β -glucana-(1 \rightarrow 4), está entre os polissacarídeos microbianos mais utilizados na indústria atualmente, produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Sua capacidade de aumentar a viscosidade de soluções e sua estabilidade ao ser congelada e

descongelada faz dela um produto altamente explorado na indústria de alimentos (MORRIS; HARDING, 2009).

Outro exemplo de EPS microbiano utilizado na indústria é a dextrana, uma α -glucana-(1 \rightarrow 6), produzida por fungos e bactérias diversos, dentre os quais estão as bactérias *Leuconostoc* (AMAM; SIDDIQUI; QADER 2012) e *Weissella* (SHUKLA et al, 2014). Dentre suas aplicações estão a restauração de volume sanguíneo (MEHVAR, 2000), produção de vacinas, crioprotetores e estabilizantes em indústrias de alimentos e cosméticos (KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005).

Há ainda a pululana, uma α -glucana linear com ligações α -(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 4) produzida pela levedura *Aureobasidium pullulans*. Sua flexibilidade e solubilidade em água têm sido explorada na indústria alimentícia (MORRIS; HARDING, 2009; SINGH; GAGANPREET; KENNEDY, 2008).

2.5 O fungo *Lasiodiplodia theobromae*

O presente estudo tem como interesse o processo de produção de EPS secretado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ, isolado de berinjela (*Solanum elongata*) (SALDANHA et al., 2007).

L. theobromae é a forma anamorfa do fungo *Botryosphaeria rhodina*. É um fungo filamentosos, fitopatogênico, causador da “podridão negra”, capaz de infectar espécies vegetais como milho, manga, graviola e berinjela (MUNIZ et al., 2011). O fungo está avaliado como organismo de risco 1, ou seja, apresenta baixo ou nenhum risco às comunidades. Infecções por *L. theobromae* são raramente relatadas na literatura médica (GAUTHIER e KELLER, 2013), sendo constatados poucos casos de feohifomicoses (SUMMERBELL et al., 2004) e pneumonia em humanos (WOO et al., 2008).

Na literatura, *L. theobromae* se destaca pela capacidade de sintetizar EPS (OLIVEIRA et al., 2015) e ácido jasmônico, um hormônio vegetal de proteção contra patógenos (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2008). O fungo foi, ainda, identificado como produtor de lipases por VENKATESAGOWDA et al. (2015).

2.6 EPS de *L. theobromae*

O EPS de *L. theobromae* é uma mistura de três cadeias: uma β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), insolúvel em água fria, e duas glucanas β -(1 \rightarrow 6) (Figura 1), solúveis em água fria, uma de 7×10^3 g/mol e outra de $1,8 \times 10^6$ g/mol. Esta última é a maior β -glucana-(1 \rightarrow 6) já descrita na literatura (OLIVEIRA et al., 2015), o que a torna especialmente interessante, uma vez que glucanas de alta massa molecular têm apresentado atividade biológica mais efetiva que glucanas de massa menor

(MIZUNO, 1996.). OLIVEIRA et al. (2015) também constataram que a β -glucana-(1 \rightarrow 6), secretada por *L. theobromae*, apresenta atividade imunomoduladora com resposta de padrão pró-inflamatório, pela secreção de TNF- α .

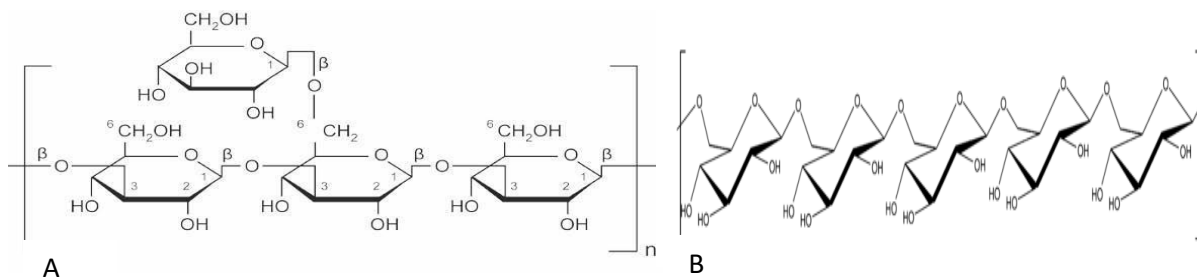


Figura 1. (A) β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) e (B) β -glucana-(1 \rightarrow 6), secretadas por *L. theobromae*. Fonte: Immuno Medic ®

Outros autores estudaram o EPS de *L. theobromae*. CUNHA et al. (2012), encontraram atividade anti proliferativa em células MCF-7, quando em contato com 100ug/mL de EPS de *L. theobromae* MMPI. Outro estudo mostrou a capacidade de coagulação do EPS de *L. theobromae* MMLR, quando sulfonado (VASCONCELOS et al., 2013). TÚRMINA et al. (2012) e SOMENSI (2014) avaliaram o potencial citotóxico do EPS de *L. theobromae* MMPI, não encontrando efeito de toxicidade sobre hemácias de ratos albinos suíços ou humanas.

2.7 Sustentabilidade em bioprocessos

Associado à necessidade de redução de custo para a viabilidade de um bioprocessos, estão os conceitos de Ecologia e Sustentabilidade Industrial. A Ecologia Industrial visa evitar a poluição ambiental, reduzindo a deposição de resíduos à natureza, além de reduzir a demanda por matérias primas, de modo que resíduos de um processo possam ser utilizados como matéria prima de outro (MARINHO; KIPERSTOK, 2000). Sustentabilidade Industrial foi definida pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento como “(...) um processo de mudança no qual a exploração dos recursos, a direção dos investimentos, a orientação do desenvolvimento tecnológico e a mudança institucional estão todos em harmonia e visando melhorar o atual e futuro potencial para atender às necessidades e aspirações humanas (...). A ideia principal dentro desses conceitos é satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de suprir suas próprias necessidades” (BRUNDTLAND, 1987). O descarte de resíduos provenientes dos sistemas de produção e consumo tem sido uma discussão recorrente, pois seu acúmulo, principalmente de resíduos tóxicos, exerce grande pressão sobre meio ambiente e,

consequentemente, sobre a qualidade de vida da população. Em 1989, a *United Nations Environment Program* (Unep) e a *Division of Technology, Industry and Environment* (DTIE) lançaram a expressão “Produção mais limpa”, que consiste na aplicação contínua de uma estratégia integrada de produção ambiental a processos, produtos e serviços, para aumentar a eficiência de produção e reduzir os riscos para o ser humano e o ambiente (GIANNETTI; ALMEIDA; BONILLA, 2007). Assim, a utilização de biomassa de *L. theobromae* no próprio bioprocessamento em que é gerada, estaria em consenso com estes conceitos, em um modo de produção sustentável.

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização nutricional da biomassa micelial de *L. theobromae*, bem como sua utilização para a produção de EPS pelo mesmo fungo.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Produção de EPS em condição padrão e obtenção de biomassa micelial;
- b) Avaliação nutricional da biomassa padrão liofilizada;
- c) Avaliação da produção de EPS por *L. theobromae*, a partir da utilização de biomassa liofilizada;
- d) Estudo de reutilização de biomassa liofilizada em cultivos subsequentes para produção de EPS;
- e) Avaliação do conteúdo nutricional das biomassas obtidas a partir dos cultivos subsequentes;
- f) Caracterização do EPS produzido a partir do cultivo suplementado com biomassa liofilizada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizado o fungo *L. theobromae*, isolado de berinjela (*S. elongata*) e cedido, gentilmente, pela Dr^a. Aneli de Melo Barbosa, pesquisadora convidada da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina-PR. A sequência gênica parcial utilizada para identificação do microrganismo está depositada no GeneBank do Centro Nacional de Informação para Biotecnologia

dos Estados Unidos (NCBI, sigla em inglês para “*National Center for Biotechnology Information*”), sob número de acesso DQ852310.1.

O microrganismo foi inoculado em meio VGA, contendo sais mínimos de VOGEL (1956) (SMV), glicose (10 g/L) e ágar (15 g/L), e mantido por 5 a 7 dias a 28°C. A cepa foi armazenada em geladeira a 4°C.

4.2 Produção de EPS em condição padrão

4.2.1 Obtenção do Inóculo

O microrganismo foi repicado em placas de Petri contendo meio VGA e mantido a 28°C por 5 dias. Após o crescimento, 2 discos de 8 mm de diâmetro foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio contendo SMV e 0,5 g/L de glicose. O pré-inóculo foi cultivado por 48h a 28°C. Após esse período, o conteúdo dos frascos foi homogeneizado por 60s em blender (Pratic Blender, Cadence) higienizado com solução de álcool 70% (v/v) por 12h, a fim de se obter a suspensão micelial, com absorvância entre 0,4 – 0,5 a 400 nm.

4.2.2 Produção do EPS em condição padrão

Um volume de 12 mL da suspensão micelial foi utilizada para inocular cada frasco Erlenmeyer de 3.000 mL, contendo 600 mL de meio de cultivo, composto por 50 g/L de sacarose e SMV. Os frascos foram mantidos em incubadora orbital, a 28°C, com velocidade de agitação de 180 rpm, por 72h. O pH do meio foi corrigido para 5,8, utilizando-se HCl 1 mol/L.

Após o cultivo, a biomassa foi separada por centrifugação a 3.800 rpm (4.000 G), por 35 minutos e tratada para utilização como suplemento ao meio de cultivo.

Ao sobrenadante foi acrescentado etanol, na proporção de 3:1 (três volumes de etanol para um volume do caldo), para a precipitação do EPS. Após 24 h, o EPS foi separado do caldo com álcool, por filtração simples, e quantificado por gravimetria, após secagem a 70°C.

4.3 Tratamentos da Biomassa utilização como suplemento ao meio de cultivo

4.3.1 Biomassa liofilizada

Após o cultivo do microrganismo, a biomassa foi separada por centrifugação a 3.800 rpm, por 35 minutos e lavada, por duas vezes, com solução de NaCl 0,15 mol/L, repetindo-se a

centrifugação. A biomassa foi autoclavada e liofilizada em liofilizador. Após a secagem, a biomassa foi triturada, tamisada – para obtenção de partículas entre 0,5 e 1 mm – e utilizada como componente em meio de cultivo para a produção de EPS. A biomassa produzida e tratada como descrito foi denominada Biomassa A.

4.4 Produção de EPS utilizando biomassa liofilizada como suplemento de meio de cultivo.

A adição de biomassa como nutriente em meio cultivo para produção de EPS foi estudada em duas etapas. A primeira consistiu na avaliação de meios com diferentes formulações e, a segunda, na avaliação da utilização de biomassa em cultivos sequenciais, a partir da melhor formulação da etapa anterior. A figura 2 representa as etapas realizadas.

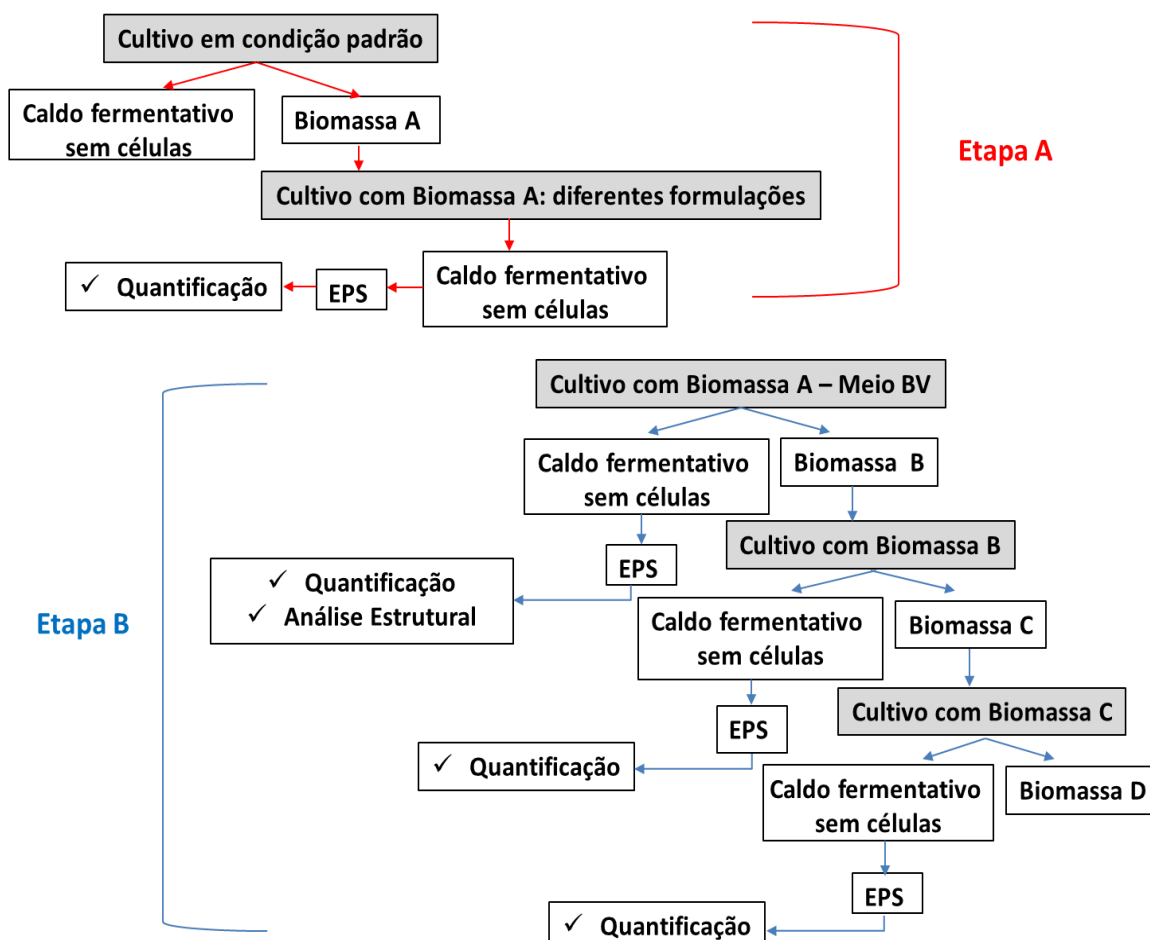


Figura 2. Etapas da produção de EPS em cultivos suplementados com biomassa de *L. theobromae*. **Etapa A:** Avaliação dos meios com diferentes formulações contendo Biomassa A obtida em meio de cultivo padrão (Sacarose 50g/L, SMV, Nitrato de Amônio 2g/L). **Etapa B:** Produção de EPS em cultivos sequenciais, suplementados com biomassa de *L. theobromae*. Em cada etapa, a biomassa foi identificada com as letras A, B, C e D, para distinção das diferentes condições de cultivo das quais foram originadas.

4.4.1 Estudo de composição de meio de cultivo

O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 4.2.1. A suspensão micelial (1 mL) foi utilizada para inocular frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo. Um volume de 2,5 mg de cloranfenicol foi adicionado em cada frasco, conforme OLIVEIRA, (2014). Os frascos foram mantidos em incubadora orbital, a 28°C, com velocidade de agitação de 180 rpm, por 72 h. O pH do meio de cultivo (pH 5,8) foi corrigido com HCl 1 mol/L.

Foram analisadas 6 formulações de meio de cultivo contendo biomassa entre 20 e 60 g/L:

- a) Meio BSVN: biomassa, sacarose 50g/L, SMV, nitrato de amônio 2g/L;
- b) Meio BSV: biomassa, sacarose 50g/L, SMV;
- c) Meio BVN: biomassa, SMV, nitrato de amônio 2g/L;
- d) Meio BV: biomassa, SMV;
- e) Meio BN: biomassa e nitrato de amônio 2g/L;
- f) Meio B: biomassa.

Após centrifugação (3.800 rpm, 35 min), a biomassa resultante do cultivo foi seca a 70°C, em estufa, até peso constante, e quantificada por gravimetria. Não foi possível separar a biomassa oferecida como fonte de nutriente da biomassa resultante, inviabilizando a medida de crescimento celular neste experimento.

Ao sobrenadante foi acrescentado etanol, na proporção de 3:1 (três volumes de etanol para um volume do caldo), para a precipitação do EPS. Após 24 h, o EPS foi quantificado por gravimetria, após secagem a 70°C.

4.5 Utilização de biomassa em cultivos subsequentes

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.2.1. Um volume de 1 mL da suspensão micelial foi utilizado para inocular cada frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo, composto por 40 g/L de biomassa liofilizada de cultivo anterior e SMV, sem nitrato de amônio. Um volume de 2,5 mg de cloranfenicol foi adicionado em cada frasco. Os frascos foram mantidos em incubadora orbital, a 28°C, com velocidade de agitação de 180 rpm. O pH do meio foi de 5,8, corrigido com HCl 1 mol/L.

Após centrifugação (3.800 rpm, 35 min), a biomassa resultante do cultivo foi seca a 70°C, em estufa, até peso constante, e quantificada por gravimetria. Não foi possível separar a

biomassa oferecida como fonte de nutriente da biomassa resultante, inviabilizando a medida de crescimento celular neste experimento.

Ao sobrenadante, foi acrescentado etanol, na proporção de 3:1 (três volumes de etanol para um volume do caldo), para a precipitação do EPS. Após 24h, o EPS foi quantificado por gravimetria, após secagem a 70°C.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Análise de açúcares

Para a determinação de açúcares totais nas amostras de caldo fermentado, e da quantidade total de açúcares na biomassa usada como substrato, foi utilizado o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Para a determinação de açúcar redutor nos meios referentes ao pré-inóculo, foi utilizado o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

4.6.2 Análise de amônio

Para a determinação da quantidade de amônio nos meios de cultivos, no caldo fermentado e nas amostras de biomassa usada como substrato, adaptou-se o método para determinação de ureia a partir de kit comercial (Bioclin – Ref.: K047). Neste método, na presença de salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, a amônia origina um composto esverdeado, quantificado em espectrofotômetro a 600 nm. Foi utilizado, como padrão, solução de nitrato de amônio, a 4,2 g/L.

4.6.3 Análise de nitrogênio α amino

A determinação de nitrogênio α -amino nos meios de cultivos, no caldo fermentado e nas amostras de biomassa utilizadas como substrato, foi realizada pelo método da ninhidrina, utilizando glicina como padrão, de acordo com metodologia de LIE (1973).

4.6.4 Análise de proteínas

A determinação da quantidade de proteínas nos meios de cultivos, no caldo fermentado e nas amostras de biomassa usada como substrato, foi feita de acordo com o método proposto por BRADFORD (1976).

4.6.5 Análise bromatológica e de minerais

A análise bromatológica das biomassas foi feita pelo Centro de Pesquisa em Ciências (CEPECI) da Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA) utilizando os métodos de Weende e Kjeldahl (A.O.A.C., 1993).

As biomassas também foram analisadas quanto à concentração de minerais, incluindo C e N. As análises foram feitas no Laboratório de Análises Agropecuárias, Assis-SP, de acordo com as metodologias descritas por MALAVOLTA et al. (1997), utilizando-se Bloco Digestor Tecnal, modelo TE007MP e Espectômetro de Absorção Atômica Agilent, modelo 55AA. Extrato de levedura (Vetec) e *Saccharomyces cerevisiae* (Fermix[®]), comercializada para panificação, foram analisados para comparação.

4.6.6 Separação dos diferentes EPS de *L. theobromae* pelo método de congelamento e degelo

Os EPSs produzidos nos cultivos suplementados com biomassas, obtidos através da extração alcoólica, foram submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo (OLIVEIRA et al., 2015). O processo foi repetido de 5 a 7 vezes para a separação das glucanas solúveis e insolúveis em água fria (23 °C), como elucidado na figura 3.

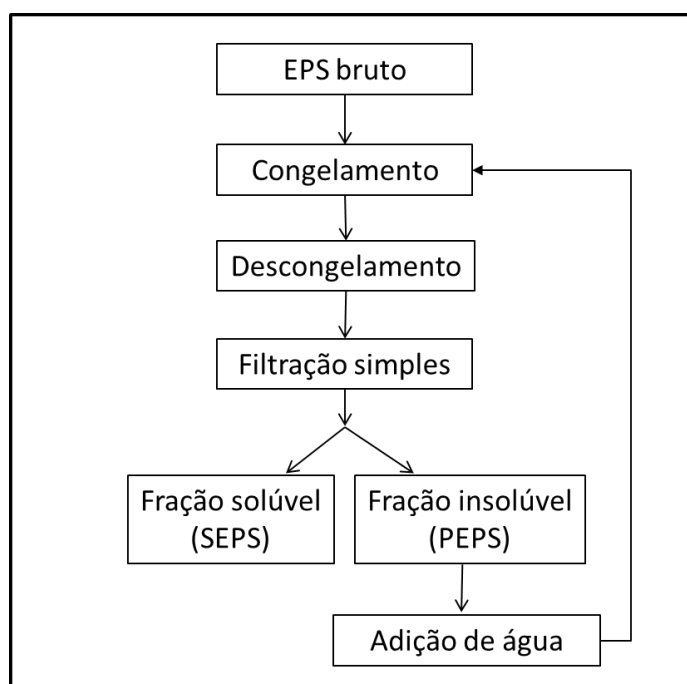


Figura 3. Separação das frações do exopolissacarídeo de *Lasiodiplodia theobromae*. A fração SEPS corresponde à fração solúvel em água fria e a PEPS, à fração insolúvel em água fria.

4.6.7 Caracterização estrutural, por ressonância Magnética Nuclear (RMN), dos EPSs de *L. theobromae*, produzidos em cultivos suplementados com Biomassas

As análises foram realizadas em espectrômetro BRUKER (modelo Avance-DRX-400), a 50°C, com amostras das frações separadas do EPS. As amostras foram solubilizadas em D2O (óxido de deutério) ou DMSO-d6 (dimetilsulfóxido deuterado), dependendo da solubilidade. Os deslocamentos químicos (δ) das amostras solúveis em D2O foram expressos em ppm relativos aos sinais de ^{13}C em δ 30,20, e aos sinais de DMSO-d6 em δ 39,70, para aquelas amostras nesse solvente.

4.6.8 Quantificação de polissacarídeo residual das biomassas obtidas nos cultivos

Concentrações de 20, 40 e 60 g/L das biomassas liofilizadas obtidas nos cultivos foram transferidas para frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio composto por SMV, sem nitrato de amônio. Os conteúdos foram mantidos em autoclave a 121°C por 15min. Depois, foram centrifugados a 3.800 rpm por 35 min. Ao sobrenadante, foi acrescentado etanol, na proporção de 3:1 (três volumes de etanol para um volume do caldo), para a precipitação do polissacarídeo. Após 24 h, o polissacarídeo foi separado do caldo com álcool, por filtração simples, e quantificado por gravimetria, após secagem a 70°C.

4.7 Análise dos resultados

Os resultados obtidos, em triplicada, nos ensaios descritos neste projeto foram analisados por comparação de média e desvio padrão dos valores obtidos, através do software estatístico OriginPro – versão 6.0, Origin Lab Corporation.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de EPS em condição padrão

Para produção de EPS em condição padrão, o inóculo é preparado com glicose 0,5 g/L, enquanto a fermentação é realizada com sacarose 50 g/L, ambos com SMV contendo nitrato de amônio. Os cultivos padrão foram realizados em frascos de 3000 mL, com o objetivo de se obter EPS e biomassa suficientes para a realização dos testes. Assim, vários ensaios foram realizados e a

média dos resultados obtidos está apresentada na Tabela 1. Em média observou-se a produção de 1,35 g/L de EPS e 17 g/L de biomassa.

Os nutrientes adicionados ao meio de cultivo foram analisados, tanto na etapa de inóculo quanto de produção de EPS. Pode-se observar que, ao final da etapa de pré-inóculo (48h), enquanto a glicose está exaurida, a concentração de amônio se mantém. Aparentemente, o microrganismo utiliza o nitrato como fonte de nitrogênio e não amônio. Esta hipótese ainda será confirmada. Por outro lado, ao final das 72h de cultivo, nota-se que houve consumo quase que total do íon, sugerindo que, apesar de o fungo não o metabolizar no início de seu crescimento, o íon é necessário para a produção de EPS. Entretanto, FARIÑA et al. (1998), no cultivo de *Sclerotium rolfsii*, concluíram que a produção de escleroglucana foi aumentada usando nitrato (25,2 g/L), enquanto o íon NH_4^+ inibia a biossíntese de EPS.

Ao final da etapa de inóculo, observa-se a secreção de proteínas e outras moléculas nitrogenadas para o meio extracelular, sendo detectado $1,32 \times 10^{-3}$ g/L de N α amino e 0,03 g/L de proteínas.

Tabela 1. Variação de nutrientes durante cultivo padrão de *L. theobromae*.

Tempo (h)	0	48	0 ^a	72
Componentes solúveis (g/L)				
Açúcar redutor	0,42	0	-	-
Açúcar total	0,51	0,04	56,13	1,29
NH₄	0,349	0,319	0,327	0,014
N α amino	0	$1,32 \times 10^{-3}$	0	10^{-5}
Proteína	0	0,03	0	0,03
Produtos (g/L)				
EPS	nd	nd	nd	1,35
Biomassa	0	0	nd	17,04

a: meio de cultivo sem inoculo; **nd:** não determinado. Período de 0-48h: fase de inóculo; período de 0^a-72h: fase de produção de EPS.

Já na etapa de produção de EPS, verificou-se o consumo de 97% do açúcar adicionado ao meio de cultivo, assim como de 96% do amônio. A partir dos dados de consumo de açúcar, pode-se observar um rendimento $Y_{p/s}$ de 0,02, $Y_{x/s}$ de 0,31, $Y_{p/x}$ 0,08 e $Y_{x/p}$ de 12,62.

Os valores obtidos ficaram abaixo dos demonstrados por OLIVEIRA et al. (2015), que obtiveram um rendimento $Y_{p/s}$ de 0,05, $Y_{x/s}$ de 0,52 e $Y_{x/p}$ de 9,7. É comum encontrar na literatura

menores rendimentos de produto e maior crescimento microbiano. STELUTI et al. (2004) obtiveram, no cultivo de *Botryosphaeria* sp., 17,7 g/L de biomassa contra 3,1 g/L de polissacarídeo, quando cultivado em sacarose ($Y_{x/p}$ 5,7). SMIDERLE et al. (2012), em seus estudos com o fungo *Pleurotus pulmonarius*, obtiveram 0,36 g/L de exopolissacarídeo e 9,07 g/L de biomassa micelial, em cultivo suplementado com glicose ($Y_{x/p}$ 25,2). PAPINUTTI (2010) obteve 0,11 g/L de EPS contra 1,91 g/L de biomassa, nos cultivos de *Ganoderma lucidum*, em meios suplementados com sacarose ($Y_{x/p}$ 17,3). O elevado crescimento micelial e consequente produção de resíduo torna imprescindível a destinação da biomassa de um bioprocesso.

A biomassa obtida nos cultivos em condição padrão foi denominada Biomassa A e utilizada nos experimentos seguintes.

5.2 Composição nutricional da Biomassa A após cultivo em condição padrão

A Biomassa A foi liofilizada e analisada quanto à composição bromatológica e de minerais. Os resultados obtidos na análise bromatológica da biomassa estimularam a proposta de sua utilização como suplemento nos cultivos de *L. theobromae*, principalmente quando os valores nutricionais foram comparados aos nutrientes oferecidos pelo extrato ou pela levedura íntegra de *S. cerevisiae*, disponíveis comercialmente (Tabela 2).

A Biomassa A apresenta 33% de proteína bruta, que representa o nitrogênio proteico e compostos nitrogenados não-proteicos, tais como aminas, amidas, nitrilas e aminoácidos. A riqueza nutricional da biomassa micelial de *L. theobromae* pode ser comparada à riqueza da levedura *Saccharomyces* sp, amplamente utilizada como fonte de nutrientes, por apresentar cerca de 30 a 70% em proteínas (teor considerado elevado), riqueza em vitaminas do complexo B, minerais, macro e micronutrientes (HALÁSZ, 1991).

O conteúdo de carboidratos foi expresso como fibra bruta (3%) e extrativo não nitrogenado (48%). O teor de fibra bruta representa o conteúdo de carboidratos estruturais obtidos após digestão ácida, seguida de digestão alcalina, em amostra seca e desengordurada. O conteúdo de carboidrato não estrutural foi expresso como extrativo não nitrogenado. OLIVEIRA (2014) estudou a composição monossacarídica da biomassa de *L. theobromae*, encontrando, principalmente, glicose (94% nas frações solúveis em água e 74% nas frações insolúveis em água), galactose (20%) e manose (4%) (nas frações solúveis em água). A biomassa também apresenta 5,9% de extrato etéreo, que representa o conteúdo de lipídeos e outros compostos apolares.

Embora, no presente estudo, não tenha sido realizada a análise bromatológica de células íntegras de *S. cerevisiae*, na literatura estão disponíveis dados para comparação. YAMADA et al. (2003), por exemplo, encontraram, em células dessa levedura, um conteúdo de proteínas (39,6%)

próximo ao obtido na biomassa de *L. theobromae*. Por outro lado, o valor de fibras totais foi 10 vezes superior (31,4%) ao que foi obtido com a biomassa de *L. theobromae*. O conteúdo de lipídeos também merece destaque (0,5%), já que foi 10 vezes menor na análise da levedura do que em *L. theobromae*. Em experimento semelhante, VILELA; BALDINI (1999) encontraram valores próximos aos de YAMADA et al. (2003), destoando somente em lipídeos, sendo 48% de proteínas, 24,4% de fibras totais, 8,55% de cinzas e 3,33% de lipídeos. Os resultados se repetem em outros trabalhos da literatura (CABALLERO-CÓRDOBA; SGARBIERI, 2000; VILELA; BALDINI, 1999). Todos os trabalhos citados comparavam os nutrientes de células íntegras, autolisadas e hidrolisadas de *Saccharomyces* sp., e todos concluíram que as células íntegras são as que possuem menor capacidade nutritiva.

A análise de minerais (Tabela 2) demonstrou a presença de macro e micronutrientes fundamentais ao metabolismo fúngico, como Zn, Fe, Cu, Mn, K, Mg, Ca, S e P. Tais minerais estão presentes na composição do meio de Vogel, utilizado na formulação do meio de cultivo de fungos como *Neurospora crassa* (VOGEL, 1956) e meio padrão para crescimento e produção de EPS por *L. theobromae*. Observa-se que a Biomassa A tem concentração de C 29,6% maior do que o extrato de levedura, porém concentrações de N inferiores, com 52% do N presente no extrato de levedura, e 72% do N presente nas células de levedura íntegras. Por outro lado, a Biomassa A tem concentração de fósforo 38% maior, tanto em relação ao extrato de levedura, quanto as células de *S. cerevisiae*, e há uma concentração muitas vezes superior de Ca, Mg e S na Biomassa A. Esses dados comprovam a riqueza nutricional da Biomassa A em relação a biomassa de *S. cerevisiae*.

Para avaliar comparativamente, foram realizados cultivos em meio contendo extrato de levedura 20 g/L e SMV, a fim de se aproximar da concentração de N presente em 40 g/L de Biomassa A (Tabela 5A). Obteve-se crescimento celular de 4,3 g/L e 0,93 g/L de EPS, valores inferiores, portanto, aos obtidos em cultivos apenas com biomassa de *L. theobromae*.

Tabela 2. Composição bromatológica e mineral da Biomassa A obtida em condição de cultivo padrão.

Composição bromatológica	Composição de minerais				
	Biomassa A (g/kg)		Biomassa A	Extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i>	
Extrativo Não Nitrogenado	484,60	C (g/kg)	372,70	278,51	414,5
Extrato Etéreo	59,00	N (g/kg)	51,45	98,69	71,05
Fibra Bruta	30,10	P (g/kg)	15,90	9,78	9,81
Matéria Seca	927,30	K (g/kg)	20,60	43,20	19,00
Nutriente Digestível Total	739,90	Ca (mg/kg)	78,75	1,25	0,35
Proteína Bruta	337,30	Mg (mg/kg)	395,00	0,18	1,10
Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	89,00	S (mg/kg)	1.980,00	5,98	2,17
Umidade	72,70	Fe (mg/kg)	21,50	95,00	63,00
		Zn (mg/kg)	56,50	63,00	274,00
		Cu (mg/kg)	3,50	3,00	7,00
N (Kjeldahl)	5,06%	Mn (mg/kg)	2,00	4,00	6,00

Nos experimentos subsequentes, para a utilização de Biomassa A como nutriente em meio de cultivo, esta seria autoclavada em solução aquosa. Em meio aquoso e com aquecimento, era possível supor que haveria solubilização de componentes da biomassa, que seriam mais facilmente utilizados pelo microrganismo, em relação a biomoléculas insolúveis presentes na biomassa. Dessa forma, os componentes solúveis da Biomassa A (açúcar total, N α amino, proteína e polissacarídeo) foram avaliados. O teste foi realizado com solução a 40g/L (m/v) de biomassa em solução de SMV, sem fonte de nitrogênio, autoclavado e centrifugado, conforme exemplificado na Figura 4. As análises no sobrenadante foram realizadas antes e após a adição de etanol para precipitação de polissacarídeos. Após a precipitação do polissacarídeo, o álcool foi evaporado e o volume inicial corrigido com água destilada. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

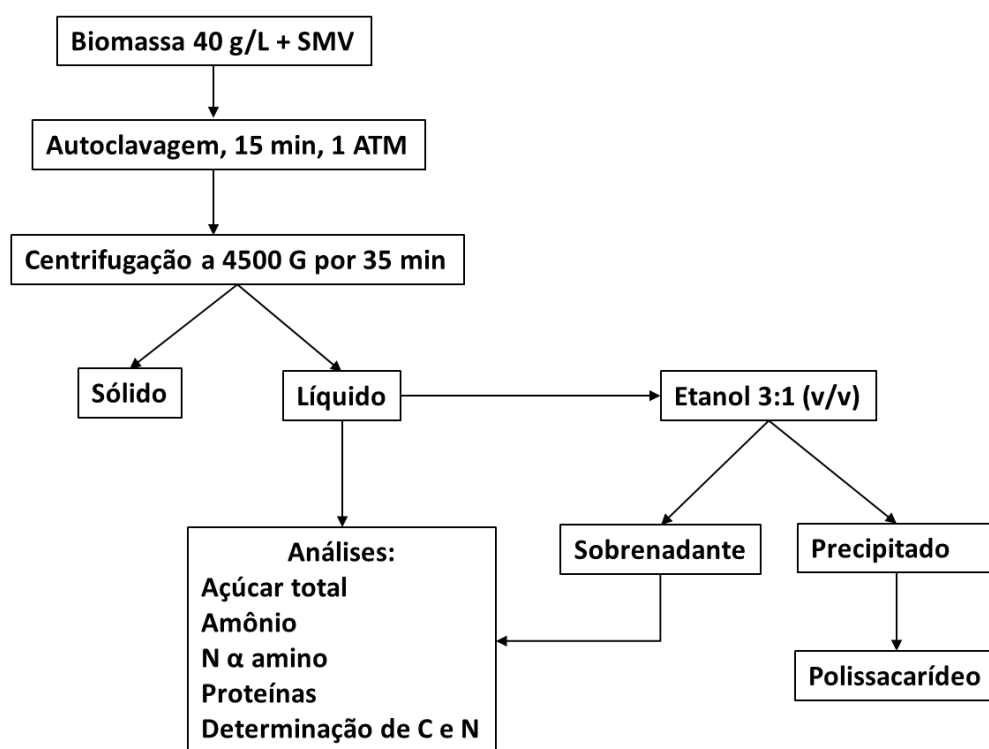


Figura 4. Análise de compostos solúveis da biomassa A.

Analisando os resultados de componentes solúveis da Biomassa A (Tabela 3), verifica-se que ocorre extração de 3,4% do C e 13,1% do N da biomassa. Em relação a proteínas e carboidratos, ocorre a extração de 4,8 e 8,4%, respectivamente. A partir de 40 g/L de Biomassa A, obteve-se a separação de 1,6 g/L de polissacarídeo, sugerindo que quase todo o açúcar extraído da biomassa (expresso como açúcar total), se tratava de polissacarídeo. É importante ressaltar que todo o material precipitado com etanol foi seco e considerado polissacarídeo, apesar de esse material estar impuro e conter também proteínas ou outras moléculas não quantificadas.

Tabela 3. Componentes solúveis da Biomassa A liofilizada, proveniente de cultivo em condição padrão de *L. theobromae*. Teste realizado com suspensão de biomassa a 40 g/L.

Análises (g/L)	Solução aquosa	Solução aquosa após tratamento com
	inicial	etanol
Açúcar total	1,64	0,47
Amônio	0,07	0,05
N α amino	8×10^{-5}	4×10^{-5}
Proteínas	0,65	0,41
Polissacarídeo	-	1,57
C	0,50	0,34
N	0,27	0,18

Considerando que o tratamento aquoso a quente resultou na extração de 4% (m/m) de polissacarídeo a partir de 40 g/L de Biomassa A, o mesmo teste foi realizado com outras concentrações de biomassa (20 e 60 g/L), para verificar a possível variação na extração de polissacarídeos (Tabela 4). Esperava-se que, nas demais concentrações de biomassa, a proporção de polissacarídeo se mantivesse. Entretanto, o resultado sugere que é possível que a condição de extração seja influenciada pela concentração de biomassa, ou, ainda, que o polissacarídeo não se distribua uniformemente pela biomassa, já que a porcentagem de polissacarídeo recuperada em solução a 40 g/L de biomassa é maior que a recuperada com concentração de 60 g/L de biomassa.

Tabela 4. Extração de polissacarídeo residual da biomassa A.

Biomassa (g/L)	Polissacarídeo (g/L)	Porcentagem de polissacarídeo em 100 g de Biomassa A (%, m/m)
20	$0,36 \pm 0,05$	1,8
40	$1,57 \pm 0,09$	4,0
60	$1,69 \pm 0,08$	2,8

5.3 Produção de EPS utilizando Biomassa A: influência de diferentes concentrações de biomassa, adição de sacarose, nitrato de amônio e sais mínimos de Vogel

A avaliação da possibilidade de aplicação da biomassa de *L. theobromae*, como suplemento de meio de cultivo para produção de EPS pelo mesmo fungo, ocorreu utilizando-se concentrações de biomassa entre 20 e 60 g/L, em 6 combinações de meio de cultivo, sendo que as letras de identificação de cada experimento estão relacionadas aos componentes adicionados: Biomassa A (B); sacarose a 50 g/L (S); sais mínimos de Vogel (V) e nitrato de amônio a 2 g/L (N). A produção de EPS foi avaliada por gravimetria e está apresentada na Figura 5.

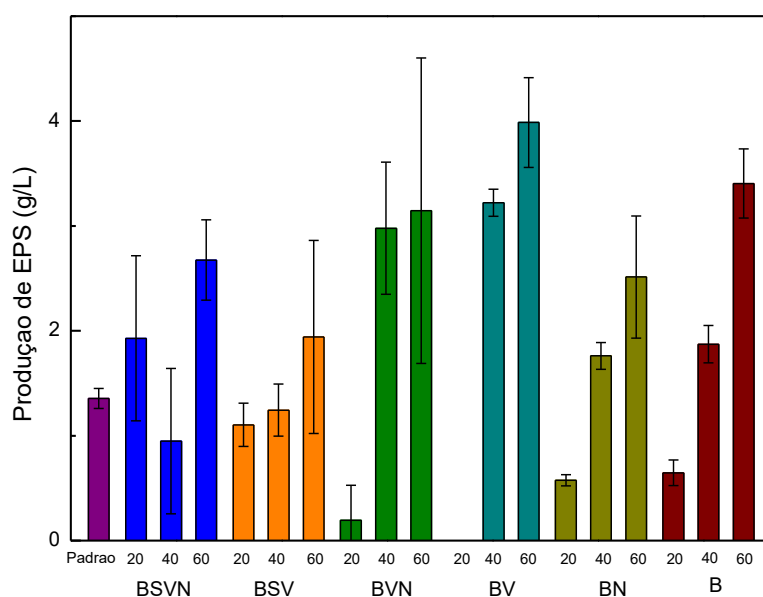


Figura 5. Produção de EPS em cultivos suplementados com biomassa de *L. theobromae*, nas concentrações de 20 a 60 g/L. Condições de cultivo: Padrão (Sacarose 50g/L, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2g/L) ■ ; BSVN (Biomassa A, Sacarose 50g/L, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ ; BSV (Biomassa A, Sacarose 50 g/L, Sais de Vogel) ■ ; BVN (Biomassa A, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ ; BV (Biomassa A e Sais de Vogel) ■ ; BN (Biomassa A e Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ e B (Biomassa A) ■ .

5.3.1 Adição de biomassa

Considerando-se as seis formulações testadas e as diferentes concentrações de Biomassa A utilizadas como suplemento (20 a 60 g/L) foram realizados dezoito experimentos. Observou-se produção de EPS em dezesseis experimentos (Figura 5), sendo que em apenas quatro condições experimentais a produção de EPS foi inferior à condição padrão (sacarose, SMV e nitrato de

amônio). Coincidentemente, a pequena produção de EPS ocorreu em meios com 20 g/L de biomassa, nos meios BVN, BV, BN e B.

Por outro lado, em onze condições experimentais observou-se maior produção de EPS do que na condição padrão, destacando-se o resultado obtido com o meio BV, no qual foram obtidos os valores mais altos de recuperação de EPS (3,22 e 3,99 g/L, utilizando 40 e 60 g/L de biomassa, respectivamente). Estes resultados, portanto, confirmam a possibilidade de utilização de biomassa para produção de EPS por *L. theobromae*.

O aumento na produção de EPS nos cultivos suplementados com biomassa pode ser explicado pela possibilidade de o fungo secretar enzimas que hidrolisem os componentes presentes na biomassa, inclusive aqueles insolúveis em água. GIESE et al. (2005) utilizaram micélio de *B. rhodina* como suplemento em meio de cultivo, para indução de secreção de β -1,3-glucanase pelo mesmo fungo, apresentando atividade entre 0,015 e 0,671 (U/mL). Outra explicação para o aumento na produção de EPS em cultivos suplementados com biomassa, é o fato de a biomassa conter nitrogênio orgânico em sua composição, proveniente de proteínas, aminoácidos e nucleotídeos, por exemplo. SURVASE; SAUDAGAR; SINGHAL (2007) constataram que a adição de lisina e uridina monofosfato (UMP) ao cultivo de *S. rolf sii*, aumentou a produção de escleroglucana de 16 g/L para 20 g/L e 22 g/L, respectivamente. Além disso, níveis intracelulares elevados do nucleotídeo proporcionaram aumento da produção de curdulana em cultivos de *Agrobacterium* (KIM et al., 1999).

5.3.2 Adição de sacarose

Comparando-se os resultados obtidos nos meios BSVN e BVN, verifica-se que a adição de sacarose ao meio contendo biomassa não colaborou com a produção de EPS (Figura 5). Isso pode ter ocorrido devido ao elevado crescimento micelial observado nos meios com sacarose (BSVN e BSV), prejudicando a secreção do EPS, conforme relataram POSCH; SPADIUT; HERWIG (2012). Por outro lado, na ausência de sacarose, o microrganismo é obrigado a mobilizar fontes de C presentes na biomassa, tanto para crescimento, quanto para produção de EPS. Embora, até o momento, não existam trabalhos descrevendo enzimas de *L. theobromae*, para *B. rhodina* foi relatada a secreção de glucanases que hidrolisam os polissacarídeos presentes em sua biomassa a oligo e monossacarídeos, permitindo que sejam utilizados pelo fungo (GIESE et al., 2006).

A biossíntese de EPS é bastante particular entre os microrganismos, mas ocorre, basicamente, em três passos: (i) Assimilação de um substrato de carbono; (ii) síntese intracelular de polissacarídeo e (iii) exsudação do polissacarídeo para fora da célula (VANDAMME, 2010). A síntese de dextrana, uma α glucana com ligações α -(1 \rightarrow 6) e ramificações em α -(1 \rightarrow 4), α -(1 \rightarrow 3), α -

(1→2), pela bactéria *Leuconostoc sp*, pode acontecer fora da célula ou dentro da parede celular, e é realizada pela enzima dextrana sacarase (PETIT, 2005). Já a levana, constituída por unidades de frutose, unidas por ligações β -(2→6), é sintetizada fora da célula. Pode ser produzida pela fermentação de sacarose pela bactéria *Zymomonas mobilis*, ou por síntese enzimática, utilizando sacarose como substrato. A biossíntese de levana depende de uma enzima extracelular específica, a levanassucarase, que catalisa a síntese de levana pela sacarose, por transfrutossilacção (DONOT et al., 2012). Nesta via, a glicose não é polimerizada, já que inibe a enzima levana invertase. A síntese de escleroglucana, β -glucana-(1→3)-(1→6) produzida pelo fungo filamentoso *S. rolfisii*, foi descrita por SCHMID; MEYER; SIEBER (2011). A via é iniciada quando glicose é transportada para dentro da célula e fosforilada, através de uma reação de hexoquinase. A glicose é isomerizada e uma UDP-glicose é formada. Esta será utilizada como substrato para a formação do polímero. Por fim, uma β -(1→3)-glucanasintase forma a β -glucana-(1→3) e, quando a glucosiltransferase incorpora a fração β -(1→6), a β -glucana-(1→3)-(1→6) é formada.

A literatura descreve que a produção de EPS por microrganismos tem como única finalidade sua proteção (DONOT et al., 2012). Além disso, CERNING et al. (1994) afirmam que o EPS não representa reserva de energia e que os microrganismos são incapazes de catabolizá-lo. Isso parece se confirmar quando botriosferana, EPS produzido por *B. rhodina*, é oferecida ao mesmo fungo como fonte de carbono. Os resultados mostraram que não houve crescimento do fungo, o que aconteceu somente quando glicose foi adicionada ao mesmo meio de cultivo (GIESE et al., 2005).

Comparando as diferentes composições de meio de cultivo, em relação à concentração de C (Tabela 5 A), observa-se que os cultivos sem sacarose (meios B, BV, BVN e BN) apresentam 35 e 71% do C (20 e 40 g/L de biomassa, respectivamente) contido no meio de cultivo padrão. Apenas com a adição de 60 g/L de biomassa alcançou-se a mesma concentração de C do cultivo em condição padrão (21 g/L). Entretanto, comparando a relação EPS/C (Tabela 6 A), verifica-se que todos os meios sem sacarose apresentaram maior relação do que o meio padrão, indicando que nestes meios (BVN, BV, BN, B) há maior produção de EPS por grama de C adicionado ao meio de cultivo. Inclusive, comparando os cultivos com 40 e 60 g/L de biomassa nos meios sem sacarose, não há aumento na relação EPS/C que justifique utilizar maior quantidade de biomassa. Além disso, a adição de 60 g/L de biomassa possui o agravante de aumentar a viscosidade do meio de cultivo, acrescentando dificuldade tecnológica ao bioprocessamento. Por outro lado, a utilização apenas de biomassa como fonte de carbono, em concentração de 40 g/L, proporcionou o melhor resultado de produção de EPS.

5.3.3 Adição de nitrato de amônio

Comparando-se os meios BSVN e BSV e considerando a mesma concentração de biomassa adicionada, observa-se que há variação na média de valores de EPS recuperados, porém os valores de desvio padrão se sobrepõem, indicando que a adição de nitrato de amônio não contribui com a produção de EPS por *L. theobromae* quando se adiciona biomassa no meio de cultivo (Figura 5).

Essa hipótese se confirma quando se compara a produção de EPS nos meios BN e B, nos quais, novamente, não há variação na produção de EPS (considerando a adição de 20 e 40 g/L de biomassa) ou até há maior produção na ausência de nitrato de amônio (60 g/L de biomassa em meio B) (Figura 5).

Considerando a concentração de N dos diferentes meios de cultivos (Tabela 5 A), observa-se que todos os cultivos apresentaram maior quantidade de N total do que o cultivo padrão (entre 1,5 e 5,5 vezes maior), independente da adição de nitrato de amônio. Entretanto, o aumento da concentração de N, analisado isoladamente, não proporcionou aumento na produção de EPS. Considerando a relação EPS/N (Tabela 6 A), todos os experimentos apresentaram uma relação menor do que no cultivo padrão (EPS/N de 1,93). O cultivo em meio BV a 40 g/L apresentou a relação mais alta entre os testes com biomassa, com relação EPS/N de 1,56.

Analisando a relação C/N (Figura 6), verifica-se que, nos cultivos com biomassa, as diferentes formulações proporcionaram aumento de nitrogênio em proporção maior do que o aumento de carbono. Na condição de cultivo padrão, a relação C/N foi maior do que em todos os cultivos com biomassa. Comparando os resultados de produção de EPS com a relação C/N dos diferentes meios, observa-se que os maiores valores de produção ocorreram nos meios com menor relação C/N. Os resultados obtidos contrariam dados de outros autores. GIESE et al. (2015) obtiveram rendimento de 5,2 g/L de botriosferana, em cultivos de *B. rhodina* MAMB-05 utilizando glicose e nitrato de amônio, em relação C/N de 30. Neste estudo, os autores afirmam que a relação C/N não afetou a produção de botriosferana. O mesmo foi observado em cultivos do basidiomiceto *Ganoderma applanatum* (LEE et al., 2007) e de *Paecilomyces sinclairii* (KIM et al., 2002).

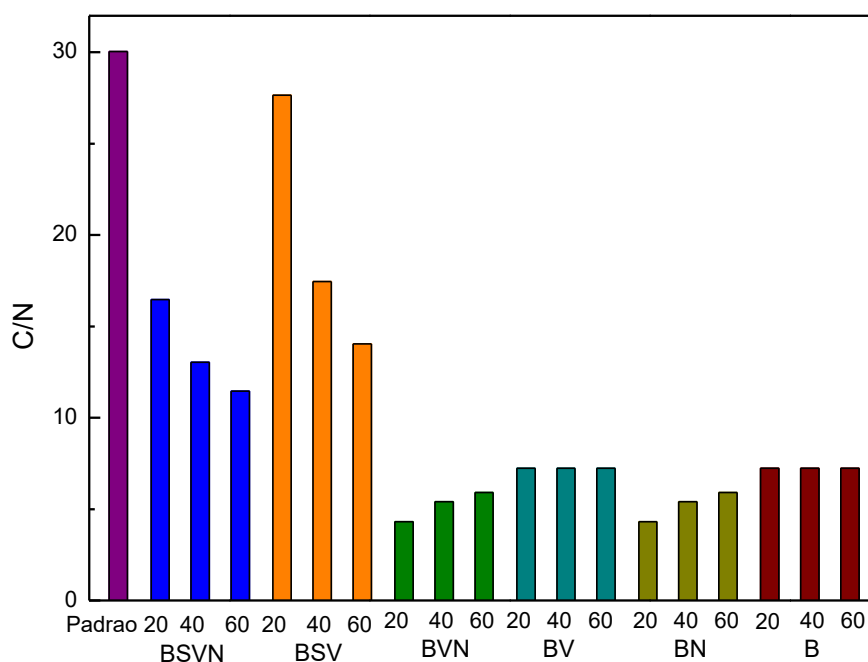


Figura 6. Relação C/N, em cada condição de cultivo. Condições de cultivo: Padrão (Sacarose 50g/L, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2g/L) ■ ; BSVN (Biomassa A, Sacarose 50g/L, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ ; BSV (Biomassa A, Sacarose 50 g/L, Sais de Vogel) ■ ; BVN (Biomassa A, Sais de Vogel, Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ ; BV (Biomassa A e Sais de Vogel) ■ ; BN (Biomassa A e Nitrato de Amônio 2 g/L) ■ e B (Biomassa A) ■ .

5.3.4 Adição de sais mínimos de Vogel

Comparando-se os meios BV e B, observa-se que ocorreu maior produção de EPS com a adição de sais mínimos de Vogel. Os maiores valores de produção de EPS foram obtidos justamente em meio BV, com a adição de 40 e 60 g/L de biomassa, obtendo-se 3,22 e 3,99 g/L de EPS, respectivamente (Figura 5).

O meio de Vogel é composto por sais que, didaticamente, foram divididos em macro e microelementos, a partir das concentrações adicionadas. Assim, foram considerados macroelementos, além de C e N, P e K, presentes na forma de KH_2PO_4 , e Mg e S, presentes na forma de MgSO_4 . Os demais (Ca, Zn, Mn, Cu e Fe) foram considerados microelementos.

Comparando a composição dos meios Padrão, BV e B (Tabela 5 A e B), observa-se que, sem a adição de sais mínimos de Vogel (meio B), as concentrações de P, K e Mg ficam reduzidas em 43, 42 e 19%, respectivamente, nos meios com 40 g/L de biomassa. Em relação a Ca, essa redução é dramática, 88%, fazendo a mesma comparação. Por outro lado, a adição de biomassa sozinha (40 g/L) proporciona uma concentração de S, Mn e Fe 3, 4 e 6 vezes maior do que no cultivo padrão, que contém sais de Vogel. Ainda assim, a maior disponibilidade de S, Mn e Fe não foi suficiente para proporcionar maior produção de EPS no meio B, em comparação com o meio

BV, indicando a importância dos demais elementos presentes nos sais de Vogel, que não são supridos pela biomassa, na produção de EPS por *L. theobromae*.

Tabela 5 A. Composição de meios de cultivo adicionados de Biomassa A e na condição padrão em relação a concentração de macronutrientes.

Experimentos	Biomassa A (g/L)	Macronutrientes (g/L)					
		C	N	P	K	Mg	S
Padrão	0	21,03	0,70	1,13	1,43	0,0197	0,026
BSVN	20	28,482	1,729	1,448	1,842	0,0276	0,0656
	40	35,938	2,758	1,766	2,254	0,0354	0,1054
	60	43,392	3,787	2,084	2,666	0,0434	0,1448
BSV	20	28,482	1,03	1,448	1,842	0,0276	0,0656
	40	35,938	2,06	1,766	2,254	0,0354	0,1054
	60	43,392	3,09	2,084	2,666	0,0434	0,1448
BVN	20	7,45	1,729	1,448	1,842	0,0276	0,0656
	40	14,91	2,758	1,766	2,254	0,0354	0,1054
	60	22,36	3,787	2,084	2,666	0,0434	0,1448
BV	20	7,45	1,03	1,448	1,842	0,0276	0,0656
	40	14,91	2,06	1,766	2,254	0,0354	0,1054
	60	22,36	3,09	2,084	2,666	0,0434	0,1448
BN	20	7,45	1,729	0,32	0,41	0,008	0,04
	40	14,91	2,758	0,64	0,82	0,016	0,08
	60	22,36	3,787	0,95	1,24	0,024	0,12
B	20	7,45	1,03	0,32	0,41	0,008	0,04
	40	14,91	2,06	0,64	0,82	0,016	0,08
	60	22,36	3,09	0,95	1,24	0,024	0,12

Obs.: Padrão: cálculo de C e N apenas a partir de sacarose e NH_4NO_3 ; P e K apenas de KH_2PO_4 e Mg e S apenas de MgSO_4 . Cores iguais entre meios de cultivo correspondem a concentrações iguais de macronutriente.

Tabela 5 B. Composição de meios de cultivo adicionados de Biomassa A e na condição padrão em relação a concentração de micronutrientes.

Experimentos	Biomassa A (g/L)	Micronutrientes (g/L)				
		Ca	Zn	Mn	Cu	Fe
Padrão	0	$2,7 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$9,9 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$
BSVN, BSV	20	$2,9 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-4}$
BV	40	$3,0 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^{-3}$	$9,8 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$
	60	$3,2 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$
BN, B	20	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-4}$
	40	$3,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$8,6 \times 10^{-4}$
	60	$4,5 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$

Tabela 6 A. Relação EPS/Macroelementos, em cada condição de cultivo.

Experimentos	Biomassa A (g/L)	Relação EPS/ Macroelementos					
		C	N	P	K	Mg	S
Padrão	0	0,064	1,929	1,195	0,944	68,53	51,92
BSVN	20	0,068	1,115	1,331	1,047	69,86	29,39
	40	0,026	0,344	0,537	0,421	26,78	8,99
	60	0,062	0,705	1,281	1,002	61,52	18,44
BSV	20	0,039	1,072	0,762	0,599	40,00	16,83
	40	0,035	0,604	0,704	0,552	35,14	11,80
	60	0,045	0,628	0,931	0,728	44,70	13,40
BVN	20	0,026	0,112	0,133	0,105	6,99	2,94
	40	0,200	1,080	1,686	1,321	84,12	28,25
	60	0,141	0,831	1,510	1,180	72,49	21,73
BV	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
	40	0,216	1,563	1,823	1,429	90,96	30,55
	60	0,178	1,290	1,913	1,495	91,84	27,53
BN	20	0,077	0,332	1,794	1,400	71,75	14,35
	40	0,118	0,638	2,750	2,146	110,00	22,00
	60	0,112	0,663	2,642	2,024	104,58	20,92
B	20	0,087	0,627	2,019	1,576	80,75	16,15
	40	0,126	0,909	2,925	2,283	117,00	23,40
	60	0,152	1,102	3,583	2,745	141,83	28,37

Obs.: valores em destaque vermelho correspondem a valores maiores do que o obtido em cultivo padrão.

Tabela 6 B. Relação EPS/Microelementos, em cada condição de cultivo.

Experimentos	Biomassa A (g/L)	Relação EPS/Microelementos				
		Ca	Zn	Mn	Cu	Fe
Padrão	0	49	675	75000	13636	9507
BSVN, BSV	20	46	431	23275	7941	2360
	BV	40	44	316	13775	5555
BN, B	60	42	250	9782	4299	942
	20	857	1194	33750	18750	3139
	40	428	597	16875	9440	1569
60	297	398	11250	6279	1046	

Obs.: valores em destaque vermelho correspondem a valores maiores do que o obtido em cultivo padrão.

Avaliando a relação EPS/S, EPS/Mn e EPS/Fe (Tabela 6 A e B), observa-se que, nos meios com adição de biomassa, não foram obtidos valores superiores aos verificados em meio padrão, indicando que a maior disponibilidade desses elementos na biomassa do que no meio de Vogel não foi acompanhada por aumento na produção de EPS.

Por outro lado, avaliando a relação EPS/P, EPS/K e EPS/Mg, observa-se que, nos meios BV e B, a relação é maior do que no meio padrão. Entretanto, em meio B, essas relações EPS/macroelementos foram maiores do que em meio BV, indicando que, mesmo com menor disponibilidade de P, K e Mg do que nos cultivos com sais de Vogel, a biomassa proporciona condições favoráveis para produção de EPS.

A presença de dois elementos, Ca e Mg, despertam atenção. São bioelementos reconhecidos como favoráveis para o crescimento micelial e produção de EPS em basidiomicetos (CHARDONNET; SAMS; CONWAY, 1999; OKBA et al., 1998), devido à capacidade do íon Ca^{2+} em alterar a permeabilidade da membrana celular, controlando o gradiente de Ca^{2+} interno e a atividade de algumas enzimas envolvidas na expansão da parede celular. O íon Mg^{2+} é essencial a todos os fungos, por ser um cofator em reações enzimáticas, além de estabilizar a membrana plasmática (KIM; YUN, 2005). CHEN et al. (2008) constataram maior produção de EPS em cultivos de *Fomes fomentarius*, quando adicionaram 0,05% destes íons, obtendo 0,88 g/L de exopolissacarídeo, contra 0,55 g/L, na condição sem os íons.

Outro elemento descrito como importante na síntese de EPS é o Zn. PILZ et al. (1991) constataram que, para a produção de escleroglucana por *S. rolfsii*, a adição de Zn^{2+} , em concentrações de 10 $\mu\text{M/L}$, aumentou a produção em até quatro vezes. Entretanto, concentração elevada do elemento (348 $\mu\text{M/L}$) prejudicou a síntese do EPS.

Além de todas as considerações apresentadas, é preciso levar em conta que, na condição padrão, todos os componentes estão solúveis. Já nos demais experimentos, os componentes estão contidos na biomassa e precisam ser metabolizados pelo fungo, para serem utilizados.

5.4 Utilização da biomassa em ciclos repetidos, em meio de cultivo BV, para a produção de EPS por *L. theobromae*

Como os melhores resultados de produção de EPS foram obtidos em meio BV, essa condição foi adotada para os experimentos subsequentes.

A produção de EPS foi avaliada utilizando biomassa em cultivos subsequentes em meio BV (Figura 7) e os resultados estão apresentados na Figura 8. Observou-se produção de EPS até o terceiro cultivo e, embora os resultados demonstrem produção decrescente, no último cultivo a produção de EPS ainda está próxima do valor obtido em cultivo padrão. Com a utilização da Biomassa D (quarto cultivo), não ocorreu produção de EPS.

O EPS produzido com as diferentes biomassas foi analisado em relação ao conteúdo de C e N, sendo calculado, a partir destes valores, o conteúdo de proteínas e carboidratos (Tabela 7). Pode-se observar que, com o reuso de biomassa, o conteúdo de proteína presente no EPS bruto é crescente, alcançando 18% no cultivo composto por Biomassa C. Ainda assim, considerando apenas o valor de EPS sem o conteúdo de proteína (barras hachuradas, Figura 8), com Biomassa B e C ainda há a produção de 87 e 71%, respectivamente, do valor de EPS obtido na condição padrão.

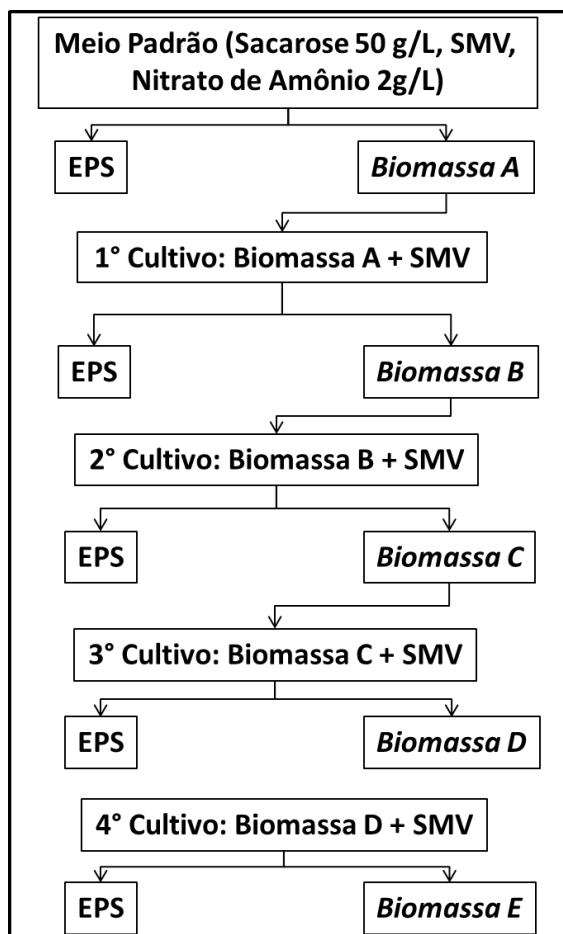


Figura 7. Etapas da utilização da biomassa, em ciclos repetidos, como suplemento de meio de cultivo para a produção de EPS por *L. theobromae*.

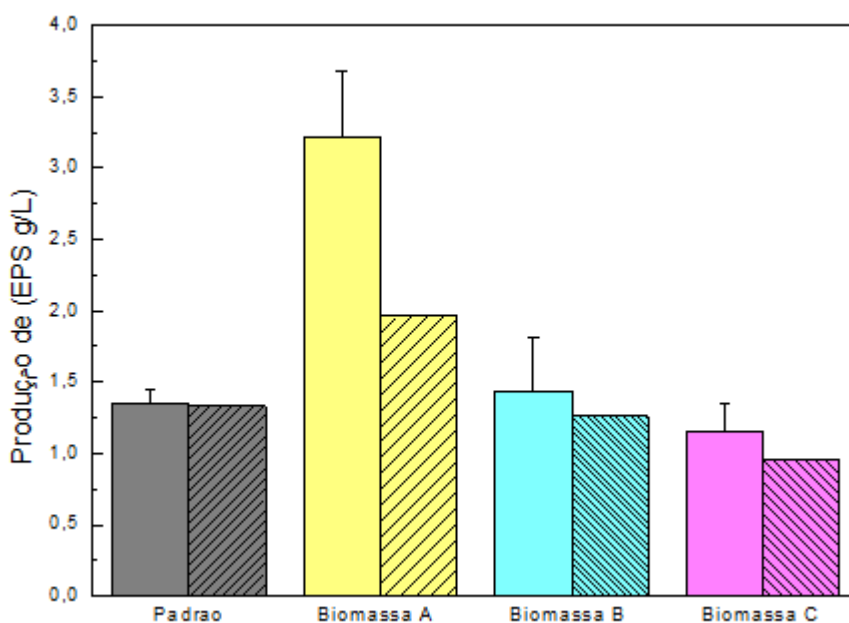


Figura 8. Produção de EPS, em ciclos repetidos, suplementados com Biomassa de *L. theobromae*. Barras hachuradas correspondem ao EPS livre de proteínas. Condições de cultivo: Padrão (Sacarose 50g/L, SMV, Nitrate de Amônio 2g/L)■; Cultivo com Biomassa A: 40g/L de Biomassa A+SMV■; Cultivo com Biomassa B: 40g/L de Biomassa B+SMV■; Cultivo com Biomassa C: 40g/L de Biomassa C+SMV■.

Tabela 7. Análise de carbono e nitrogênio do exopolissacarídeo bruto de *Lasiodiplodia theobromae*, obtido em cultivos com sacarose (padrão) ou Biomassa (A, B ou C).

Fonte de carbono	Análise do EPS bruto			
	C	N	Proteína ^a	Carboidrato ^b
	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
Sacarose (Padrão)	368	2,4	15	985
Biomassa A	356	11,8	74	926
Biomassa B	346	20,4	128	872
Biomassa C	375	28,7	179	821

a: Proteína = (N x 6,26); **b:**Carboidrato = (1000 g – Proteína (g)).

As Biomassas B, C e D foram analisadas em relação à composição bromatológica e mineral (Tabela 8). É importante destacar que as Biomassas B, C e D são compostas de biomassa residual e micélio de novo crescimento celular, pois ainda não foi possível, neste trabalho, adotar uma metodologia que permita avaliar crescimento celular em meio BV, uma vez que ao final do cultivo, ambas as biomassas (residual e de novo crescimento) são separadas em conjunto após a centrifugação.

Comparando a composição bromatológica das diferentes biomassas, observa-se aumento progressivo do conteúdo de fibra bruta, alcançando na Biomassa D um valor 7 vezes maior em relação a Biomassa A. Por outro lado, em relação à proteína bruta, ocorreu uma redução progressiva, sendo que as Biomassas C e D apresentam valores 48 e 32% menores, respectivamente, do que a Biomassa A.

Avaliando-se a composição mineral das diferentes biomassas, observa-se que ocorreu redução progressiva e dramática de alguns componentes. Houve redução de 34% e 59% no teor N e P, respectivamente, e praticamente depleção de K e Mg, quando se compara as Biomassas A e D. Por outro lado, alguns minerais parecem se acumular com a reutilização da biomassa, sendo observado entre Biomassa A e D, um aumento de 5 e 6 vezes no valor de Ca e Fe, respectivamente. Zn, Cu e Mn também se acumulam, embora em menor proporção.

Tabela 8. Composição nutricional das biomassas obtidas nos cultivos consecutivos.

Composição Bromatológica (g/kg)	Biomassa				Composição mineral (g/kg)	Biomassa				Extrato de Levedura	<i>S. cerevisiae</i>
	A	B	C	D		A	B	C	D		
Extrativo não nitrogenado	484,6	512,7	546,3	448,7	C	372,7	414,0	409,4	384,50	278,5	414,5
Extrato etéreo	59,0	47,1	59,6	53,30	N	51,4	46,2	31,4	33,8	98,7	71,0
Fibra bruta	30,1	82,6	171,6	221,9	P	15,9	11,7	6,2	6,5	9,8	9,8
Matéria seca	927,3	950,8	978,9	962,5	K	20,6	11,4	6,2	0,4	43,2	19,0
Nutriente digestível total	739,9	720,1	715,3	670,0	Ca	0,1	0,1	0,1	0,5	1,2x10 ⁻³	3x10 ⁻⁴
Proteína bruta	337,3	284,2	175,2	228,0	Mg	0,4	0,5	0,5	3,0x10 ⁻²	2,0x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻³
Resíduo mineral fixo (cinzas)	89,0	73,4	47,3	48,1	S	2,0	2,1	2,2	2,0	6,0x10 ⁻³	2,2x10 ⁻³
Umidade	72,7	49,2	21,1	37,5	Fe	2,2x10 ⁻²	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
					Zn	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3
					Cu	3,5x10 ⁻³	1,2x10 ⁻²	1,6x10 ⁻²	1,5x10 ⁻²	3,0x10 ⁻³	7,0x10 ⁻³
					Mn	2,0x10 ⁻³	3,0 x10 ⁻³	2,0x10 ⁻³	4,0x10 ⁻³	4,0x10 ⁻³	6,0x10 ⁻³

A diferença na composição química das biomassas refletiu em alterações na composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, na produção de EPS.

A Tabela 9 apresenta a composição dos meios de cultivo adicionados de biomassa, incluindo tanto os componentes solubilizados durante a etapa de autoclavagem, quanto os insolúveis.

Comparando o conteúdo de carboidrato insolúvel, houve um aumento desse valor com o reuso da biomassa, entre 15 e 30%, enquanto o conteúdo de proteína, ao contrário, decresce até 43% (cultivo com Biomassa C). Considerando o conteúdo de C e N dos compostos insolúveis, verifica-se que o valor de C oscila entre 15 e 16 g/L, enquanto o valor de N diminui quase pela metade quando se compara Biomassa A e Biomassas C/D. Esses resultados se refletem na relação C/N, sendo obtido no cultivo com Biomassa A a menor relação C/N, de 7,1.

Comparando-se os meios preparados com Biomassa B, C e D, eles apresentaram valores de açúcar solúvel entre 30 e 70% menores do que com Biomassa A, o que pode representar uma primeira diferença que justifique a produção decrescente de EPS. Com Biomassas A e B, o microrganismo também tem disponível 0,7 g/L de proteína solúvel, o que é diferente do cultivo padrão, no qual há apenas N inorgânico, na concentração de 2 g/L. Por outro lado, nos cultivos com Biomassa C e D havia a metade do valor de proteína solúvel em relação aos cultivos com Biomassa A e B. Ao final do cultivo, como as análises do meio foram realizadas após o tratamento do caldo com etanol, é provável que as proteínas tenham precipitado juntamente com o EPS, o que explica o teor de proteínas solúveis bem menor do que o inicial em todos os cultivos. Vale ressaltar que a medida de proteínas sem a remoção do EPS é bastante difícil, pela viscosidade e turvação do meio e precipitação do polissacarídeo no reagente analítico.

Tabela 9. Variação de nutrientes, durante cultivo na condição BV, nos cultivos com biomassas de *L. theobromae*.

Time (h)	Biomassas no meio BV							
	A		B		C		D	
	0 ^b	72 ^c	0 ^b	72 ^c	0 ^b	72 ^c	0 ^b	72 ^c
Componentes solúveis (g/L)								
Açúcar total	2,1	0,3	1,3	0,2	0,6	0,5	0,8	0,4
Amônio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
N α amino	5,1x10 ⁻³	6,0x10 ⁻⁵	2,4x10 ⁻⁴	3,0x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵
Proteína	0,7	<0,1	0,7	<0,1	0,3	<0,1	0,3	<0,1
Componentes insolúveis^a (g/L)								
Carboidratos insolúveis	20,6	nd	23,8	nd	28,7	nd	26,8	nd
Lipídeos	2,4	nd	1,9	nd	2,9	nd	2,1	nd
Proteína bruta	13,1	nd	11,2	nd	7,5	nd	8,1	nd
C	14,9	nd	16,6	nd	16,4	nd	15,4	nd
N	2,1	nd	1,8	nd	1,2	nd	1,3	nd
C/N	7,1		9,2		13,6		11,8	
Produtos (g/L)								
EPS		3,2±0,1		1,4±0,4		1,2±0,2		0
Biomassa		32,0±0,6		31,6±0,7		31,2±1,5		31,7±0,7

a: calculado a partir da análise bromatológica e de minerais da biomassa (Tabela 8), considerando a adição de 40 g/L de biomassa liofilizada (carboidratos: extrativo não nitrogenado + fibra bruta; Lipídeos: outros extrativos); b: meio sem inóculo, c: Após a extração de EPS por adição de etanol.; nd: não determinado.

5.5 Caracterização estrutural dos EPSs obtidos nos cultivos em meio BV

Os EPSs produzidos nos cultivos suplementados com Biomassas foram dialisados e liofilizados para caracterização estrutural. Os EPSs brutos foram fracionados, conforme OLIVEIRA et al. (2015), que desenvolveram o protocolo utilizando a mesma cepa fúngica do presente estudo, cultivado em condição padrão (sacarose 50 g/L, SMV e 2 g/L de nitrato de amônio). O fracionamento dos EPSs de *L. theobromae*, realizado como demonstrado da Figura 2, deu origem a duas frações: uma insolúvel em água fria, denominada fração PEPS (EPS precipitado) e uma fração de polissacarídeos solúveis em água fria (fração SEPS, EPS solúvel).

No trabalho descrito por OLIVEIRA et al. (2015), observou-se que o EPS produzido por *L. theobromae* era composto por três β -glucanas, uma cadeia de β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), presente na fração PEPS e outras duas cadeias de β -(1 \rightarrow 6)-glucanas (frações SEPS-005R e SEPS-10E), com massa molar de $1,8 \times 10^6$ Da e $7,0 \times 10^3$ Da, respectivamente. De acordo com os autores, 67% do EPS consistiam de glucana ramificada e 25% de glucanas lineares. A partir destes dados, esperava-se que os EPSs secretados em meio BV também fossem constituídos de β -glucanas.

Para confirmar a estrutura dos polissacarídeos produzidos em meio suplementado com Biomassa A, ambas as frações foram analisadas por RMN e os resultados estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

Com relação à fração PEPS, o espectro sugere uma β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), devido ao sinal C1, δ 102,9 ppm. Há indícios de outro polissacarídeo presente, mas ainda não foi possível determinar sua estrutura, podendo se tratar de carboidrato com ligação alfa, devido aos sinais de carbono anomérico em δ 99,5 e δ 100,4 (Figura 9). Quanto à fração SEPS, o espectro mostra uma β -glucana-(1 \rightarrow 6), devido ao sinal δ 68,6 ppm, além de sinais de monossacarídeos furanosídicos, devido a presença de sinais anoméricos em δ 107,1, 107,3 e 108,3 (Figura 10).

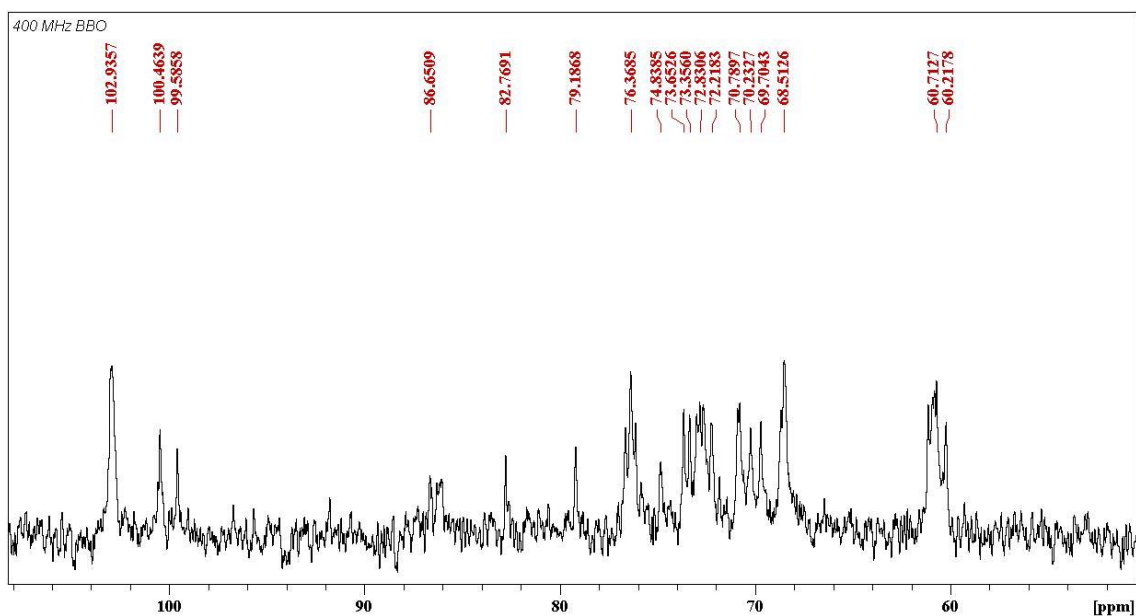


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C , “400 MHz, em D $_2$ O ou DMSO- d_6 ”, da β -D-glucana-(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6) presente na fração PEPS, produzida em meio Suplementado com Biomassa A.

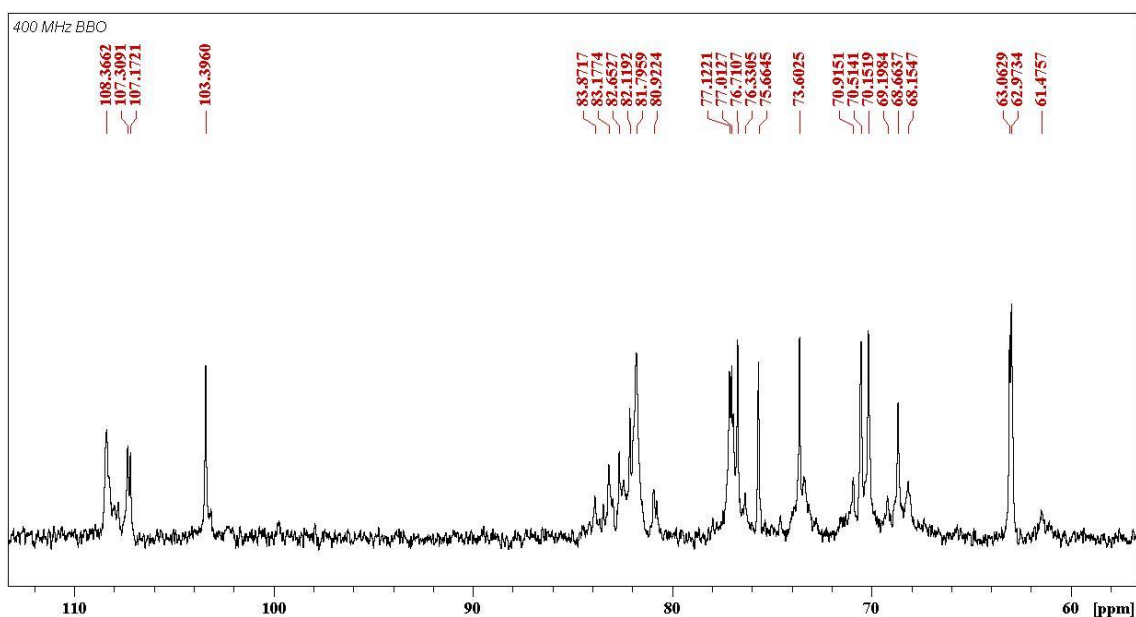


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C , “400 MHz, em D $_2$ O ou DMSO- d_6 ”, da β -D-glucana-(1 \rightarrow 6) presente na fração SEPS, produzida em meio Suplementado com Biomassa A.

Com relação aos EPSs produzidos em cultivos suplementados com Biomassas B e C, as frações solúveis (SEPS) apresentaram espectros iguais, indicando a presença do mesmo polissacarídeo (Figuras 11 e 12). Entretanto, os espectros mostraram somente sinais anoméricos, sem sinais de β -glucanas-(1 \rightarrow 6), apresentando-se, então, diferentes da fração solúvel do EPS produzido em condições padrão e da fração solúvel do EPS produzido com Biomassa A.

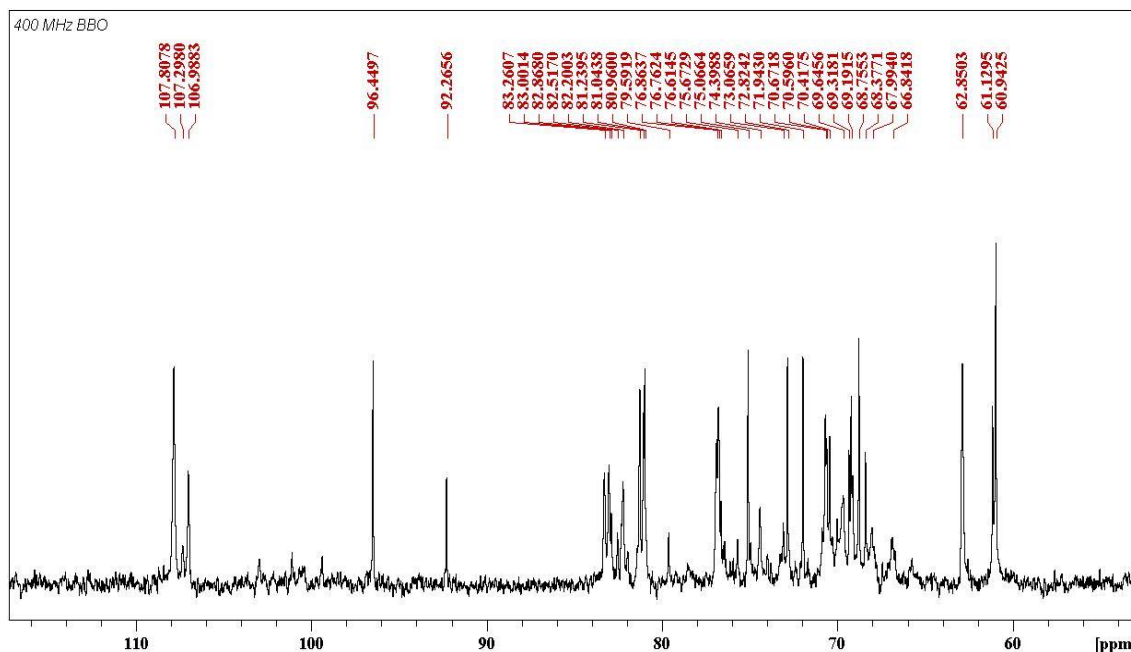


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C , “400 MHz, em D₂O ou DMSO-d₆”, do polissacarídeo presente na fração SEPS, produzido em meio Suplementado com Biomassa B.

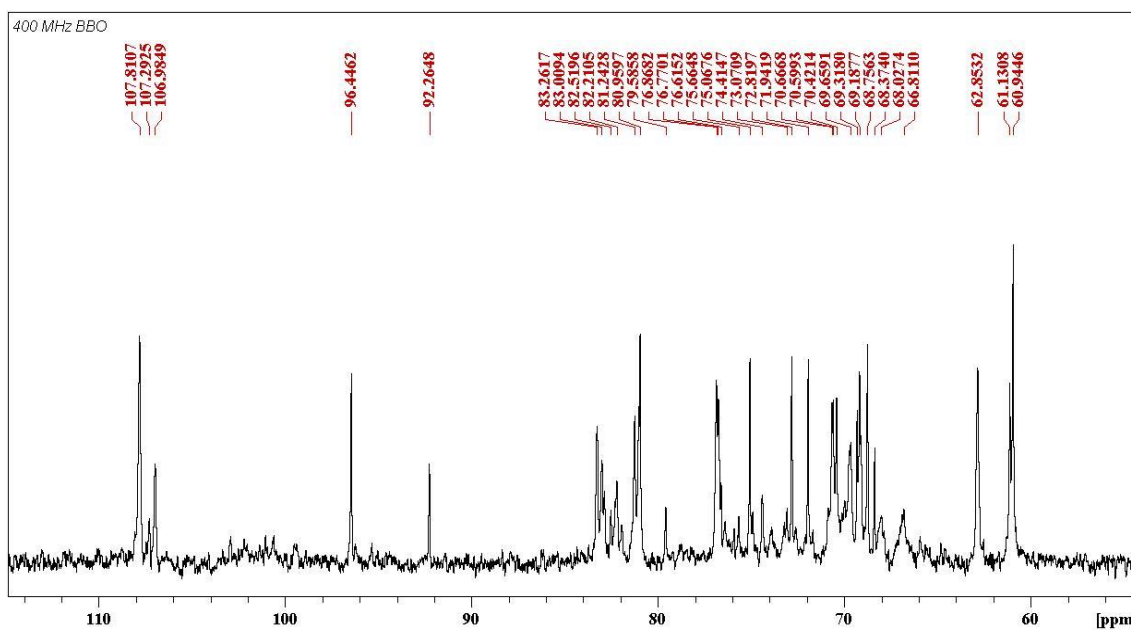


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C , “400 MHz, em D₂O ou DMSO-d₆”, do polissacarídeo presente na fração SEPS, produzido em meio Suplementado com Biomassa C.

Com relação à fração insolúvel (PEPS), o espectro da fração produzida em meio suplementado com Biomassa B não mostrou sinais correspondentes à polissacarídeos (Figura 13), evidenciando que o material não se tratava de polissacarídeo intra ou extracelular. Já na fração produzida em meio suplementado com Biomassa C, não foi possível a realização do teste, devido à insolubilidade do material.

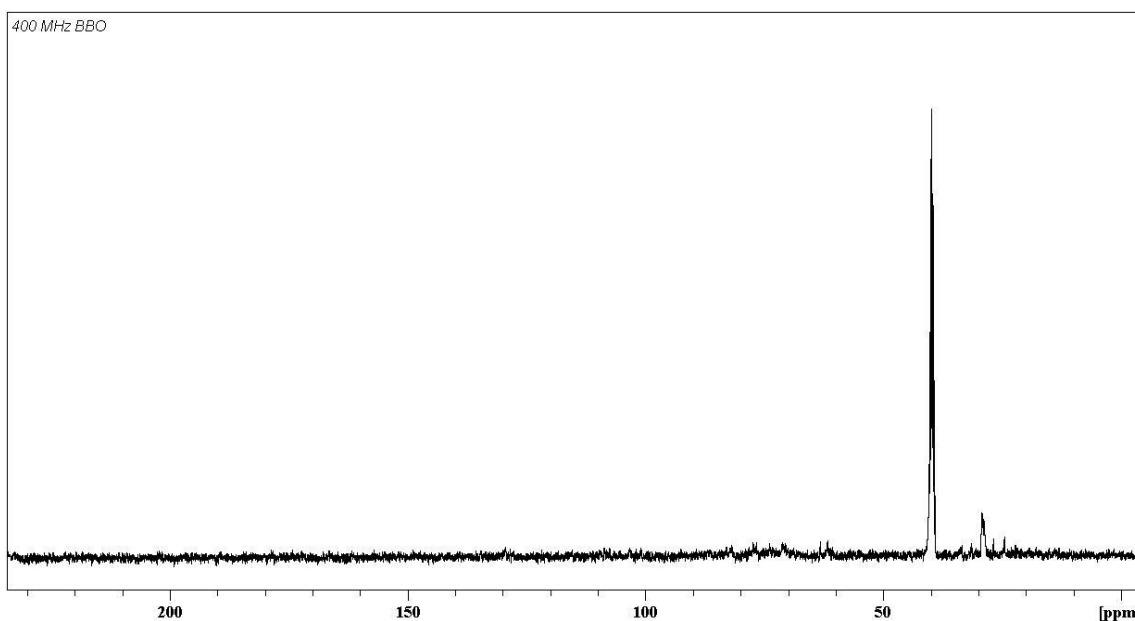


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C , “400 MHz, em D₂O ou DMSO-d₆”, da fração PEPS, produzido em meio Suplementado com Biomassa C.

Dessa forma, há indicativos de que, em meio BV suplementado com Biomassa A, ocorra a produção das mesmas β -glucanas já descritas em meio de cultivo padrão. Entretanto, é provável que também estejam presentes cadeias extraídas da própria biomassa, intracelulares ou de parede celular. Estudos posteriores serão necessários para esclarecer estes dados.

6. CONCLUSÕES

As análises da composição das biomassas de *L. theobromae* evidenciaram sua eficiência nutritiva, apresentando valores de macro e microelementos necessários a meios de cultivo microbianos. A elevada produção de EPS em meios de cultivo suplementados com biomassa confirmam sua riqueza e eficiência nutricional. Além disso, a indicação de semelhança do EPS obtido nestes cultivos com o EPS produzido em condição padrão sugere que a utilização da biomassa como suplemento ao meio de cultivo não traz desvantagens, já que não altera as características do produto de interesse, além de reduzir significativamente os custos do bioprocessamento e colaborar com a diminuição de impactos ambientais, causados pela deposição de resíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAM, A.; SIDDIQUI, N.N.; QADER; S.A.U. Characterization and potential application oh high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1, **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.910-915, 2012.

A.O.A.C. Association of Official and Agricultural Chemistry. **Official Methods of Analysis**, 12^a edição, Washington, D.C., 1094 p., 1993.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Whey: An Alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565–598, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUNDTLAND, G. **Report of the World Commision on Environement and Development: Our Common Future: UN Documents Gathering a body of global agreements**, 1987. Disponível em: < <http://www.un-documents.net/wced-ocf.htm> > Data de acesso: 18 de novembro de 2015.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 341–351, 2000.

CARVALHO, N, H, C. **Aspectos Econômicos da GERIPA**, In: Análise da viabilidade econômica de um modelo de produção de energia e alimentos, GERIPA, em comparação com a produção tradicional de etanol no Brasil, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 38, 2010.

CAVKA, A. et al. Biorefining of wood: combined production of ethanol and xylanase from waste fiber sludge. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 891–899, 2011.

CERNING, J. et al. Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 11, p. 3914–9, 1994.

CHAE, H. J.; JOO, H.; IN, M. J. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 3, p. 253–258, 2001.

CHARDONNET, C. O.; SAMS, C. E.; CONWAY, W. S. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 967–973, 1999.

CHEN, W. et al. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3187–3194, 2008.

CHI, Z. et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Qingdao, v. 82, n. 5, p. 793–804, 2009.

CORRADI DA SILVA, M.L.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.

CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D: -glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–88, ago. 2012.

DENG, C. et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules** v.51, n.1, p. 70–75, 2012.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, V. R. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 3, p. 636–43, 2008.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2002.

FARIÑA, J. I. et al. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 9, p. 825–831, 1998.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77–84, 2010.

GAUTHIER, G. M.; KELLER, N. P. Crossover fungal pathogens: The biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. **Fungal Genetics and Biology**, v.61, p. 146–157, 2013.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7, p. 471–499, 2005.

GIANNETTI, B. F.; ALMEIDA, C. M. V. B.; BONILLA, S. H. **A ecologia industrial dentro do conceito empresarial**, 2007.
<http://www.advancesincleanerproduction.net/papers/journals/2007/2007_Banas_ecoindlemp.pdf>
Advances in Cleaner Production Network. Data de acesso: 03 de dezembro de 2015.

GIESE, E. C. et al. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3783–3788, 2005.

GIESE, E. C. et al. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1265–1271, 2006.

GIESE, E. C. et al. Evaluation of Fermentative Parameters for the Production of Botryosphaeran (a (1,3;1,6)- β -D-glucan) and Mycelial Biomass by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 36-43, março de 2015. <www.orbital.ufms.br> Acesso em 02 de dezembro de 2015.

HALÀSZ, A. L. **Use of yeast biomass in food production**. CRC Press, 312p., 1991.

ImmunoMedic, **Why fungal beta glucan?** Disponível em <<http://immunomedic.com/what-is-beta-1316-d-glucan-beta-glucan/>> Acesso em 05 de outubro de 2015.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hidrolizing enzymes: Fundamentals and applications, **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 69, n. 2, p.306-325, 2005.

KIM, H. O.; YUN, J. W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 728–738, 2005.

KIM, M. K. et al. Higher intracellular levels of uridine monophosphate under nitrogen-limited conditions enhance the metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species. **Biotech. Bioeng.**, v. 62, p. 317-323, 1999.

KIM, M.S.; PARK, Y.D.; LEE, S. R. Preparation method of beta-glucan from schizophyllum commune and composition for external application comprising the same. US20080160043 A1. US 11/778, 489. 16 jul. 2007, 3 jul. 2008. *Phytotherapy research*, n. 28, p. 159–166.

KIM, S. W. et al. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 6, p. 389–93, 2002.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013.

LEE, W. Y. et al. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 249–254, 2007.

LIE, S. The Ebc-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 1, p. 37–41, 1973.

LO, W. et al. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2723–2736, 1999.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas - princípios e aplicações**. Editora POTAFÓS, 2º ed., ESTADO, 309p., 1997.

MARINHO, M.; KIPERSTOK, A. Ecologia industrial e prevenção da poluição: uma contribuição ao debate regional. Rede de Tecnologias Limpas. **TECBAHIA Revista Baiana de Tecnologia**, p. 47–61, 2000. < http://teclim.ufba.br/site/material_online/publicacoes/pub_art10.pdf.> TECLIM –. Data de acesso: 17 de setembro de 2015.

MEHVAR, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents, **Journal of Controlles Release**, v.69, n. 1, p.1-25, 2000.

MILLER, G. L. Determination of reducing sugar by DNS method. **Anal chem**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MISHRA, A.; KUMAR, S. Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 681–685, 2007.

MITCHELL, D. A. et al. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state system. **Biotechnology Bioengng**, v. 38, p. 353–362, 1992.

MIZUNO, T. A Development of Antitumor Polysaccharides from Mushroom Fungi. **Foods & Food Ingrid Journ Jpn**, v. 167, p. 69–85, 1996.

MORRIS, G.; HARDING, S. Polysaccharides, Microbial. In: **Encyclopedia of Microbiology**. Elsevier, p. 482-494, 2009.

MUNIZ, C. R. et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 419–28, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 55–61, 2000.

NORONHA, E. F. et al. Regulation of 36 kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum* **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 19–20, 2000.

OKBA, A. K. et al. Effects of bacitracin and excess Mg^{2+} on submerged mycelial growth of *Streptomyces azureus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 28–33, 1998.

OLIVEIRA, K. S. M. **Otimização do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção de EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos**, Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), 133p., Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

OLIVEIRA, K. S. M. et al. (1→6)- and (1→3)-(1→6)- β -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 539–546, 2015.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Cost analysis in laccase production. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 11, p. 2907–2912, 2011.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 143–152, 2003.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 22, p. 189–259, 2004.

PAPINUTTI, L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1941–1946, 2010.

PARK, K. M.; PARK, B. H.; SO, S.; KIM, M. S.; KIM, J. S.; KIM, Y. T.; LEE, S. G.; LEE, D. C. Composition for external application containing β -1,6-branched- β -1,3-glucan. US 6251877 B1 2001. US 09/228,958. 12 jan. 1999, 26 jun. 2001. *Phytotherapy research*, n. 28, p. 159–166.

PETIT, A. C. **Modifications d'un exopolysaccharide biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes hydrothermaux profonds**, Tese (Doutorado ENSCR), 195p., Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Rennes, 2005.

PILZ, F. et al. A high-affinity Zn^{2+} uptake systems control growth and biosynthesis of an extracellular branched β -1,3- β -1,6-glucan in *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205. **Exp Mycol.**, v. 15, n. 3, p. 181-192, 1991.

POSCH, A. E.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 7, p. 499–510, 2012.

SALDANHA, R. L. et al. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cellwall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.259–264, 2007

SCHMID, J.; MEYER, V.; SIEBER, V. Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 937–947, 2011.

SELBMANN, L; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Applied Microbiology**, v. 34, p. 51- 55. 2002.

SEVIOUR, R.; STASINOPOULOS, S.; AUER, D.; GIBBS, P. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279-298, 1992.

SHUKLA, S. et al. *Weissella confuse* Cab3 dextransucrase: properties and in vitro synthesis of dextran and glucooligosaccharides. **Carbohydrate polymers**, v.101, p.554-564, 2014.

SINGH, R. S.; GAGANPREET, S. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v.73, N. 4, p.515-531, 2008.

SMIDERLE, F. R. et al. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 368–376, 2012.

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de β -(1→6)-d-glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica. Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SONIA et al. Exploration of biocatalytic potential of bacterial isolates from the soils of Uttarakhand. **Annals of Agri Bio Research**, v. 19, n. 3, p. 391–398, 2014.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480–486, 2004.

SUMMERBELL, R. C. et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 543–547, 2004.

SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Enhanced production of scleroglucan by *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156 by use of metabolic precursors. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 410-415, 2007.

TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological Assessment of β -(1-6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298-14309, 2012.

UMASHANKAR, H. et al. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 307–309, 1996.

VANDAMME, E. J. Industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 253–254, 2010.

VAN NISTELRROIJ, H. J. M. et al. Penicillin update, In: Mateles RI. **Penicillin: a paradigm for biotechnology**. Candida Corp., Chicago, 1998, pp 85-91.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–14, 2013.

VENKATESAGOWDA, B. et al. Solid-state fermentation of coconut kernel-cake as substrate for the production of lipases by the coconut kernel-associated fungus *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 129–142, 2015.

VILELA, E. S. D.; BALDINI, V. L. S. Pilot Plant Production of Yeast (*Saccharomyces* sp.) Derivatives for Use as Ingredients in Food Formulations. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 119–125, 1999.

VOGEL, H. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bull**, v. 13, p. 42–43, 1956.

WOO, P. C. Y. et al. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 1, p. 380–4, 2008.

WUCHERPFENNIG, T.; LAKOWITZ, A.; KRULL, R. Comprehension of viscous morphology — Evaluation of fractal and conventional parameters for rheological characterization of *Aspergillus niger* culture broth. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 124–132, 2013.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423–432, 2003.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of α -(1->3)-D-glucan from *Lentinus edodes* in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v.327, p.431-438, 2000.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of betaglucans. **Food Hydrocolloids**, Hong Kong, v. 52, p. 275-288, 2016.