

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/04/2017.

---

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<sup>a</sup>. 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 bioprocessos / 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 bioprocessos

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 *Lasiosiphonia 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  $\beta$ -glucana-(1→3)-(1→6) insolúvel em água fria, e uma  $\beta$ -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  $\beta$ -(1 → 3) - (1 → 6)-glucan, insoluble in cold water, and a  $\beta$ -(1 → 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
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. ESTADO DA ARTE</b> .....	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
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
3.1 Objetivos específicos.....	19
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	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 $\alpha$ 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
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
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
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 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  $\beta$ -glucanas.  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanas fúngicas. DENG et al. (2012) demonstraram, *in vitro*, a atividade antioxidante de uma  $\beta$ -D-glucana secretada pelo fungo basidiomiceto *Dictyophora indusiata*. Uma glucana do tipo  $\beta$ -(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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucana-(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6), insolúvel em água fria, e duas glucanas  $\beta$ -(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.

## 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<sup>a</sup> 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)- $\beta$ -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  $\beta$ -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](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  $\beta$ -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  $\beta$ -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)- $\beta$ -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](http://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](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  $\beta$ -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)- $\beta$ -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  $\beta$ -1,6-branched- $\beta$ -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  $\beta$ -1,3- $\beta$ -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  $\beta$ -(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  $\beta$ -(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  $\beta$ -(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  $\alpha$ -(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.