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

Otimização do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção de EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos

KASSANDRA SUSSI MUSTAFÉ OLIVEIRA

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

Março - 2014



Kassandra Sussi Mustafé Oliveira

Otimização do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção de EPS e
caracterização física e química dos polissacarídeos

Trabalho apresentado ao curso de Microbiologia
Aplicada como requisito para obtenção do Título de
doutor em Microbiologia Aplicada pela Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Orientadora: Dra Valéria Marta Gomes do Nascimento
Co-orientadora: Dra Lucimara Mach Côrtes Cordeiro

Rio Claro

2013

576
O48o Oliveira, Kassandra Sussi Mustafé
 Otimização do cultivo de *Lasioidiplodia theobromae* para obtenção de
 EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos / Kassandra
 Sussi Mustafé Oliveira. - Rio Claro, 2014
 131 f. : il., figs., gráfs., forms., tabs., fots.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
 Biotecnologia de Rio Claro
 Orientador: Valéria Marta Gomes do Nascimento
 Coorientador: Lucimara Mach Côrtes Cordeiro

 1. Microorganismos. 2. Reologia. 3. Aeração. 4. Glucanas. 5. Fungos
 filamentosos. 6. Bioprocessos. 7. Microbiologia industrial. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Otimização em frascos agitados e estudo de aeração em fermentador no cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para caracterização física do caldo fermentado e caracterização química de suas glucanas

AUTORA: KASSANDRA SUSSI MUSTAFÉ OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIMARA MACH CÔRTEZ CORDEIRO


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


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


Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis


Prof. Dr. EUTÍMIO GUSTAVO FERNÁNDEZ NÚÑEZ
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis


Profa. Dra. FHERNANDA RIBEIRO SMIDERLE
Departamento de Bioquímica / Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas


Profa. Dra. FERNANDA FOGAGNOLI S. TOSIN
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas

Data da realização: 11 de fevereiro de 2014.

Aos meus irmãos. Aos meus pais.

Ao poder da Renovação.

Seja bem vinda, Malu.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que rege magnificamente os passos de cada criatura na Terra. Que Sua Sabedoria possa conduzir com muito amor e justiça a vida de cada um que amo. Obrigada por sua luz.

À toda minha família. Vocês são minha estrutura, minha fonte de força quando já não tenho mais, minha finalidade de luta diária, meu porque de levantar e seguir. Obrigada mamãe por ser meu exemplo completo. Obrigada pai por acreditar em mim. Obrigada Kamyille por ser parceira desde a infância. Obrigada Malu. Obrigada Leonardo, por ser um “bro” lindo e o companheiro de república mais tranquilo de todos os tempos. Obrigada aos meus avós lindos que tanto amo.

À tia Marluce e à tia Toninha, que me ciceronearam no caminho da vida.

À Dra Valéria Marta Gomes de Lima. Uma professora, educadora e pesquisadora inspiradora (poesia!). Ter a oportunidade de trabalhar com você foi fundamental para minha formação.

À Dra Lucimara Mach Cortes Cordeiro, co-orientadora generosa, paciente e doce, que me recebeu com acolhida única em seu Laboratório. Agradeço inclusive às princesas Geórgia Erdmann e Thaisa Moro por dividirem comigo o tempo de nossa “profa”.

Agradeço aos professores Eutímio G. F. Núñez; Fhernanda Ribeiro Smiderle e Fernanda S. F. Tosin pelas valiosas observações na banca de defesa desta tese. Sem o enriquecimento que deram, ao trabalho e aos meus olhos, o trabalho não estaria tão próximo do imaginado. Em especial à professora Ivanise Guilherme Branco que fez brotar em mim uma engenheira (quando nem imaginava ser uma) e por me abrir os olhos para tantos detalhes maravilhosos que Bioprocessos e Reologia podem ter.

À Denise Zugman e Larissa Holtz que colaboraram com meu aprimoramento pessoal.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Aneli de Melo Barbosa, pela cepa usada neste estudo.

À UNESP – Campus de Rio Claro e ao Programa de Pós em Microbiologia Aplicada.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas e encontros no Simpósio de Microbiologia Aplicada, fazendo com que a parte das bolsas empregada nas viagens semanais mais parecessem um investimento.

Aos colegas de Rio Claro que sempre me ajudaram durante as disciplinas, com alojamento, bons papos e incentivo. Principalmente aos amigos Adriano Uemura, Alexandre Somera, Andrea Araújo, Eduardo Mitter, Maíra Pereira, Paulo Lopes e Renato Montagnoli.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação do IB- Rio Claro, pela paciência e atenção prestada a todos os alunos remotos.

À UNESP – Campus de Assis, pela infra-estrutura e pelos incríveis colegas de trabalho. Também pela oportunidade de ser Professora Substituta em uma Instituição que tanto respeito, e que faz parte da minha história há mais de dez anos. Gratidão às turmas XXIII da Biologia, e turmas VIII e X da Engenharia Biotecnológica.

Aos professores Marcelo Nogueira, Rondinelli Herculano e Karina Toledo pelas ricas discussões e por compartilharem comigo sua visão de Ciência.

Aos parceiros de pesquisa de *Botry* e *Lasio*: Amanda Flora, Ana Beatriz Aranha, Antonio Assay, Felipe Berto, Franciane Figueiredo, Gabrielle Carvalho, Isabela Silva, Mirela Di Bastiani, Tais Toni, Tania Sila Campioni e Yara Bueno. Agradeço a paciência! E por dividirem comigo a curiosidade e o prazer de estudar fungos e a encarar seus desafios. Pela troca de energia tão positiva! Vocês são responsáveis pelo trabalho ter ficado tão próximo ao esperado. Aos colegas do LBBIO (Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos) que fizeram com que as horas no lab fossem mais agradáveis. Obrigada Anderson Lourenção, Aline Freitas, Bruno Oliveira, Cintia Carignatto, Diogo Pessoa, Ernani Lezier, Gilberto Coradi, Herina Satie, Luiz Edson Loiola e Rachid dos Santos. Obrigada também ao Sérgio Moraes pelo incentivo. Agradeço cada passo próximo a este grupo.

Aos companheiros de aventuras da Biblioteca Acacio J. Sta Rosa: Auro, Paula, Sérgio Rocha, Cleomar, e em nome deles agradeço todos funcionários que tem satisfação em colaborar. A tantos outros funcionários da UNESP - Assis que me ajudaram com sorrisos: Adriano, Alessandro, Allan Chiea, Arnaldo, Fernando, Gilberto Milani, Jorge, Miro, Raul, Rodovaldo, Sivaldo. Alguns me ajudaram até a retirar o fermentador da autoclave e a fazer sua manutenção pra continuar os experimentos sem percalços. Obrigada pela força!

Ao grupo de Bioquímica de Carboidratos da UFPR (Universidade Federal do Paraná), onde encontrei pessoas com quem eu podia trocar informações sobre biologia, física e química de carboidratos e compartilhar minha paixão por gomas. Foi breve, mas riquíssimo!! Agradeço às guardiãs do 252. Vocês me inspiraram muito profundamente. Fernanda Simas com a paixão pela Reologia, habilidade com tudo e pelo apoio com os experimentos no reômetro; Fhernanda Smiderle pela naturalidade, conhecimento e sua postura com cada dia; Elaine Kiatkoski pela força pra olhar pra frente, e Márcia Lange Silveira por sua leveza em compartilhar. E todas vocês me inspiraram em sua paixão e atitude com a pesquisa e o ensino. Obrigada por dividirem comigo tempo e espaço. Aos colegas dos demais labs: Alexsandro Nogueira, Aline Santana, Ana Helena Gracher, Andrea Ruthes, Arquimedes Santana, Daniel Riter, Danilo Carneiro, Diego “Popó”, Elisa Dahmer, Flavio Beilke, Heide Koop (reencontro [1]), Juliane Carlotto, Lauro Souza, Lucia Vriesmann (reencontro [2]), Rhayla Meneguim, Tati Machado e Yanna Rattmann. Aos queridíssimos Larry Ramos e Aramis Pereira, pela ajuda valiosa com os perfis de RMN, por me ajudarem com protocolos, pelo incentivo pra me fazer continuar. Às companheiras da rep: Bya Corrêa, Layla Coelho e Patrícia Luz.

À Rosane e Elisângela, pelo acolhimento carinhoso e pelas análises no HPSEC e GC.

Agradeço aos professores Marcello Iacomini, Thales Cipriani, Guilherme Sasaki e Phillip Gorin, pois permitiram que eu me sentisse menos acuada meio aos Grandes Mestres dos Carboidratos.

À Fundação Araucária, que permitiu que eu usufruísse de uma infra-estrutura magnífica e de pessoal super qualificado para estudo dos polissacarídeos desta tese.

À B.O. Que me renova as energias, oxigena meu cérebro, e proporciona encontros únicos. Andrea Guerra, Bruna Russo, Carol Martinelli, Cássio Oliveira, Daniel Barroso, Danilo Zelic, Du Almeida, Eric, Esther Castellano, Everton Souza, Guilherme Peraro, Jéssica Gottschalk, Jéssica Tonniatti, Joana Felipe, Karen Almeida, Kwame, Luiz Sant'Anna, Luther Cagnin, Monique Sasaki, Pauline, Rafael da Cól, Vanessa Bonfá, Vinícius Lopes e aos mestres Felipe, Fábio, Augusto, Leo.. em nome de vocês agradeço TODOS que fazem/fizeram parte do grupo, quem tem esse sangue nas veias!

Aos queridos amigos Aurélio Fajar, Gabriel Vilardi, Ricardo Leite (“my old guys”) e também à Tati Domingues. Parceiros de comelaças, papos científicos ou não, quando as aflições da pós-graduação vinham à tona, pra depois retomar tudo com mais garra...

Ao Felipe Delestro, pelo incentivo, pelo exemplo, pela ajuda braçal com o software do viscosímetro.. enfim, por ser um solucionador-de-problemas tão otimista e persistente!

Ao Clube: Bruna Escaramboni, Bruno Crulhas, Cleto Kaveski, Mariana Albano, Thais Caçula e Thais Riofi. Meu otimismo vem também de vocês.

Aos novos e velhos amigos. Entre eles Alejandra Pascasio, Antonio Yoshimatsu, Cristina José, Fran Lopes, Gabi Adami, Gabi Balazini, Graziella Mazieri, Jean Roveri, Luiz ABDEFGZ, Mariana FonteBoa, Mariana Veauvy, Mirian Costa, Nathalia Rosa, Tamaya Ribeiro, Thais Dainez, e claro, aos BIOTECS TURMA I!

Aos amigos de Iturama, André Vilela, Letícia P. Urzedo e Lygia Cabral Oliveira.

À irmã Fabiana Amaral e Pr. Gilsomar Amaral, pelas palavras de força em tantos momentos.

Aos criadores do Mendeley®, do Salonpas® e do Dorflex®!! Hahahaha...

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (MCTI) pela aprovação e financiamento do curso “*Análisis, diseño y optimización de reactores biológicos para diferentes aplicaciones biotecnológicas*”, na Universidad Nacional del Litoral (UNL), em Santa Fé (Argentina) onde recebi informações fundamentais para este trabalho, principalmente na discussão dos cultivos em bioreatores e reologia de caldo fermentativo. Foi espetacular encontrar companheiros que também gostam tanto desse assunto, que muito me agrada e desafia. Muita muita gratidão aos professores María de los Milagros Ballari, Guillermo A. Sihufe e Alejandro Trombert, e estendo os agradecimentos a cada professor envolvido no curso. A todos colegas do Brasil (os “chicos” Esteban Vidal, Jocélia Mendes, Laisa Reis), Argentina, Uruguai, Colômbia, Moçambique! Muy agradecida de tenerlos en mi vida!

À Eraldo e Carla, que receberam com tanto carinho seus filhos no mundo.

Ao querido Ralph Gomes de Oliveira. Paciente e gentil, por ter trazido paz, otimismo, tranquilidade e um sorriso maravilhoso pra minha vida.

A cada um que passou ou está presente em meu caminho. Sou também grata a você por estar finalizando este trabalho. Muito obrigada =)

“A vida inteira é um experimento.
Quanto mais experiências voce faz, melhor.”

(EMERSON, Ralph Waldo)

“E, como um cientista, eu não deveria falar sobre meus sentimentos. Mas, eu posso? Sinto curiosidade, e sinto fascínio, mas às vezes eu também sinto desespero. Por que escolhi estudar o cérebro, que é tão impressionante em sua complexidade, que poderia muito bem ser infinita? Soa absurdo. Como poderíamos sequer atrever a pensar que o entenderíamos? Eu ainda persisto nessa empreitada visionária. E, de fato, hoje trago novas esperanças.”

(SEUNG, S. I am my connectome. TED Global, julho. 2010)

RESUMO

Lasiodiplodia theobromae é um fungo filamentosso, causador de doenças em espécies vegetais de ampla distribuição no Brasil. Esse fungo produz exopolissacarídeo (EPS) de estrutura química não definida completamente. Além disso, o estudo de cultivo em meio quimicamente definido e os parâmetro fermentativos em bioreator ainda são limitados. Neste trabalho são apresentados a otimização da fermentação submersa de *L. theobromae* MMBJ em agitador orbital; o estudo de aeração em bioreator; as características reológicas dos caldos fermentativos e também as estruturas químicas dos polissacarídeos presentes no EPS e no micélio do fungo. O EPS purificado e fracionado é composto de três diferentes glucanas. Uma delas, uma β -(1→3)-(1→6)-glucana insolúvel em água fria, foi o EPS de maior rendimento (67% p/p). As outras duas são β -(1→6)-glucanas, sendo uma de 7×10^3 g/mol e outra de $1,8 \times 10^6$ g/mol. A glucana solúvel de maior peso molecular é a maior β -(1→6)-glucana já descrita e pode ser explorada para uso farmacêutico, uma vez que atividades imunomoduladoras estão associadas ao tamanho da cadeia. Dentre as fontes de carbono (sacarose P.A., sacarose comercial, glicose, frutose, lactose e melação) e nitrogênio (nitrato de amônio, fosfato de amônio, nitrato de sódio e uréia) foram selecionados sacarose comercial e nitrato de amônio como mais adequadas para síntese de EPS. Na otimização usando DCCR 2², a formulação de meio que favoreceu síntese de produto foi composta de 56,6 g/L de sacarose comercial e 2,03 g/L de nitrato de amônio. Esse mesmo meio, quando em bioreator a 0,8 vvm (agitação fixada em 300 rpm), proporciona maior síntese de EPS, numa concentração de 7,35 g/L, sendo 1,8 g/L de β -(1→6)-glucanas e 5,5 g/L de β -(1→3)-(1→6)-glucana, após 72 h de cultivo. Diferentemente, os cultivos a 1,5 vvm favoreceram o crescimento celular, com 12,5 g/L de biomassa; máxima conversão de $Y_{X/S}$ de 0,47 g/g e máxima produtividade de biomassa (0,31 g/Lh). Caldo fermentado com e sem células apresentam características de fluido não-Newtoniano pseudoplástico. Caldo com células apresentaram maior estabilidade a frequência e temperatura que o caldo sem células, mantendo a característica de gel forte. A biomassa de *L. theobromae* cultivada em sacarose comercial ou pura apresenta em torno de 10% (p/p) de compostos apolares e aproximadamente 11% (p/p) de β -(1→6)-glucanas em seu micélio. Assim, o micélio obtido em cultivo submerso pode ser uma fonte de substrato para cultivo subsequentes ou como outra fonte de polissacarídeos. Esses resultados sugerem que a diversidade de estruturas obtidas em cultivo pode proporcionar diferentes possibilidades de aplicação para esses polissacarídeos, e outras estruturas podem ser obtidas através de modificação química. Os parâmetros fermentativos e o k_{LA} apresentados neste trabalho podem fundamentar os estudos de ampliação de escala para esse e outros bioprocessos com fungos filamentosos.

Palavras-chave: Reologia. Aeração. Fungos filamentosos. k_{LA} . Glucanas. Bioprocessos. Ampliação de escala.

ABSTRACT

Lasiodiplodia theobromae is phytopathogenic fungus causing gummosis in plant species that are widely distributed in Brazil. This fungus produces exopolysaccharide (EPS) but its chemical structure is not completely defined. Furthermore, the studies of fermentation in defined medium and parameters in bioreactor cultures are still limited. This work describes the optimization using Response Surface Methodology (RSM) in orbital shaker, an aeration study in stirred-tank bioreactor, an early rheological characterization of fermentation broths, and also a refined structure evaluation from the EPS produced by *L. theobromae* MMBJ. The polysaccharides from mycelia were also described. Fractionated and purified EPS show the presence of three different glucans. One of them, a chilled water insoluble β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan, was the EPS with higher yield (67% w/w). The other two are soluble β -(1 \rightarrow 6)-glucans, one with 7×10^3 g/mol and the other with 1.8×10^6 g/mol. The glucan with higher molecular weight is the largest β -(1 \rightarrow 6)-glucan described and can be applied for pharmaceutical uses, since immunomodulatory effects are usually associated with molecular weight. Commercial sucrose and Ammonium nitrate were chosen among carbon (pure sucrose, commercial sucrose, glucose, fructose, lactose or sugar cane molasses) and nitrogen sources (ammonium nitrate, ammonium phosphate, sodium nitrate or urea) as most suitable for EPS biosynthesis. The Box-Behnken design using RSM showed that 56.6 g/L of commercial sucrose and 2.03 g/L of ammonium nitrate is the formulation that promotes EPS synthesis. This medium formulation was also used in bioreactor at 0.8 vvm or 1.5 vvm (agitation set at 300 rpm). The lower aeration rate promoted EPS synthesis, confirmed by the maximum EPS concentration obtained (7.35 g/L) after 72 hours. From total EPS amount, 1.8 g/L were β -(1 \rightarrow 6)-glucans and 5.5 g/L were β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucan. Differently, cultures at 1.5 vvm increased cell growth to 12.5 g/L after 48 hours, and showed maximum $Y_{X/S}$ yields (0.47 g/g) and maximum biomass productivity ($P_X=0.31$ g/Lh). Fermentation broth with or without cells have characteristics of non-Newtonian pseudoplastic fluid. Broth with cells exhibited more stability under increased frequency and temperature ranges than the broth without cells, maintaining the strong gel features. The *L. theobromae* mycelia grown in pure or commercial sucrose provides around 10% (w/w) of apolar compounds and 11% (w/w) of β -(1 \rightarrow 6)-glucan. Therefore, this first report present possibilities to use this material as supply of substrate for subsequent cultivations or as another source of polysaccharides. These results suggest that the diversity of structures may provide different possibilities for these polysaccharides, and other structures can be obtained by chemical modification. The fermentation parameters and k_{La} presented in this work can support scale-up studies for this and other bioprocesses using filamentous fungi.

Key-words: Rheology. Aeration. Filamentous fungi. k_{La} . Glucans. Bioprocesses. Scaling-up.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Conídios maduros (de cor castanha) e imaturos (transparentes) de <i>L. theobromae</i> retirados de placa com meio BDA. Microscópio ótico, aumento de 400×, corado com azul de bromofenol.....	32
Figura 2: Exemplos de equipamentos utilizados no desenvolvimento de bioprocessos. A) Agitador orbital; B) Esquema de um bioreator do tipo Tanque Agitado; C) Esquema de bioreator do tipo “air lift”	34
Figura 3: Fluxo de um fluido entre placas paralelas, sendo uma estacionária e outra móvel. O gradiente de velocidade entre as placas é a viscosidade aparente do fluido.....	39
Figura 4: Fluxograma do fracionamento dos EPS produzidos por <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	49
Figura 5: A) Esquema de Bioreator com pá de Rushton, mostrando suas dimensões: J=largura da chicana; H=altura do líquido, W= altura da pá; D_A =diâmetro da pá agitadora, E=altura entre pá agitadora e base do bioreator; L=largura da pá de Rushton, D_T =Diâmetro do vaso de reação. B) Foto da pá helicoidal utilizada nos cultivos com <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Fonte A) Adaptado de Doran (2013); B) Foto de Bruno H. de Oliveira.....	55
Figura 6: Avaliação do k_La usando o Método Dinâmico. Adaptado de Doran (2013).....	60
Figura 7: Superfície de Resposta para biomassa (A), EPS (B) e $Y_{X/S}$ (C) na fermentação de <i>L. theobromae</i> em meio contendo diferentes concentrações de sacarose comercial e nitrato de amônio, após 72h de cultivo.....	67
Figura 8: Superfície de Resposta da concentração de biomassa (A), de EPS (B), ART consumido (C), $Y_{X/S}$ (D), $Y_{P/S}$ (E) e $Y_{X/P}$ (F) na fermentação de <i>L. theobromae</i> , até 96horas, em meio contendo diferentes concentrações de sacarose comercial e nitrato de amônio.....	72

Figura 9:	Diagramas de contorno e superfícies de resposta no incremento para concentração de biomassa (A), de EPS (B) e de $Y_{X/P}$ (C) na fermentação de <i>L. theobromae</i> entre 72 e 96 h, em meio contendo sacarose comercial e nitrato de amônio.....	77
Figura 10:	Varredura de tensão em amostras de A) caldo com células e B) caldo sem células (4000 g, 30 min). Ensaios obtidos a 1 Hz. Estrela indica tensão escolhida dentro da região viscoelástica para as avaliações seguintes (0,08 em A ou 0,04 Pa em B).....	80
Figura 11:	Varredura de frequência nas amostras de A) caldo com células e B) caldo sem células (4000 g, 30 min). Ensaios realizados a 25 °C, nas tensões de 0,08 Pa ou 0,04 Pa para amostras com ou sem célula, respectivamente.....	81
Figura 12:	Curva de fluxo (A) e viscosidade aparente (B) do caldo fermentado de <i>L. theobromae</i> com e sem células (4000 g, 30 min), cultivado em frascos agitados.....	82
Figura 13:	Efeito da temperatura nos módulos G' e G'' das amostras de caldo fermentado com (A) ou sem células (B). Amostra foi submetida a aquecimento (de 5 a 30 °C) e resfriamento (30 a 5 °C) numa velocidade de 2°C/min. Coletas em 1 Hz de frequência e tensão de 0,08 ou 0,04 Pa. Pontos vermelhos indicam início do teste.....	84
Figura 14:	Esquema do fracionamento dos EPS obtidos por <i>L. theobromae</i> . R indica fração retida e E indica fração eluída na membrana de ultrafiltração.....	86
Figura 15:	Perfil de eluição em HPSEC da Fração SEPS bruta e das frações purificadas SEPS-005R e SEPS-10E, utilizando detector de índice de refração.....	87
Figura 16:	(A) Espectro HSQC ^1H - ^{13}C mostrando assinalamentos de carbono e hidrogênio e (B) Espectro RMN ^1H e COSY ^1H - ^1H mostrando o assinalamento de hidrogênio de uma β -D-glucana-(1→6) linear presente na fração SEPS-005R de <i>L. theobromae</i> . Amostra foi dissolvida em DMSO- d_6 e os dados foram coletados à temperatura de 50 °C.....	89
Figura 17:	Estrutura da β -glucana-(1→6) produzida por <i>L. theobromae</i> . Para SEPS 005R $n=2.000$ ($1,8 \times 10^6$ g/mol) e para SEPS 10E $n=8$ (7×10^3 g/mol). Fonte ilustração: Vasconcelos e colaboradores (2008).....	90

Figura 18:	(A) Espectro de RMN- ¹³ C da β-D-glucana-(1→3)-(1→6) presente na fração PEPS (B) experimento de DEPT-135 e (C) polissacarídeo PEPS-SM obtido por degradação controlada de Smith. Amostras foram dissolvidas em DMSO-d ₆ e dados foram coletados a 50 °C.....	92
Figura 19:	Provável unidade repetitiva da β-glucana-(1→3)-(1→6) (PEPS), um dos EPS isolados do cultivo submerso de <i>L. theobromae</i>	94
Figura 20:	Espectro de ¹³ C das frações de polissacarídeos obtidos de micélio <i>L. theobromae</i> cultivado em A) Glicose; B) Frutose; C) Sacarose P.A. e D) Sacarose Comercial. E) Fração precipitada dos polissacarídeos de micélio cultivado em Sacarose P. A. (SACAROSE P) e F) Fração precipitada dos polissacarídeos de micélio cultivado em Sacarose Comercial (COMERCIAL P) Solvente DMSO-d ₆ a 50 °C. Deslocamentos expressos em ppm.....	98
Figura 21:	Fotomicrografia de micélios coletados no final do cultivo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> a 0,8 vvm (A) e 1,5 vvm (B), ilustrando morfologia das células cultivadas em bioreator a 300 rpm. Imagens obtidas em microscópio ótico, em aumento de 400× com adição de solução alcoólica de azul de metileno 0,5%. Área destacada foi tratada com o algoritmo “find edges” do programa Image J (versão 1.47v). Seta branca em A indica célula inflada no filamento.....	101
Figura 22:	Efeito da aeração na cinética de fermentação, pH e concentração de oxigênio ao longo do cultivo de <i>L. theobromae</i> em biorreator. Meio contendo 56,6 g/L de sacarose comercial. Aeração de 0,8 (figuras superiores) ou 1,5 vvm (figuras inferiores).....	102
Figura 23:	Influência da taxa de cisalhamento na viscosidade aparente do meio de cultivo de <i>L. theobromae</i> em bioreator a 0,8 vvm (A) ou 1,5 vvm (B).....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Matriz do DCCR 2 ² para estudo da influência da concentração das fonte de carbono (X1) e nitrogênio (X2) no cultivo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> para produção de EPS.....	46
Tabela 2:	Influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e síntese de EPS cultivando <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	62
Tabela 3:	Matriz do DCCR 2 ² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por <i>L. theobromae</i> MMBJ por 72h.....	65
Tabela 4:	Estimativa de efeito para concentração de EPS, biomassa e fator de conversão Y _{X/S} em 72 h de cultivo por <i>L. theobromae</i> em diferentes formulações de meio.	65
Tabela 5:	ANOVA obtida para o DCCR 2 ² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de <i>L. theobromae</i> até 72h.....	66
Tabela 6:	Matriz do DCCR 2 ² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por <i>L. theobromae</i> MMBJ por 96h.....	68
Tabela 7:	Estimativa de efeito para concentração de EPS, biomassa, consumo de ART e fatores de conversão Y _{X/S} , Y _{P/S} , e Y _{X/P} em 96 h de cultivo por <i>L. theobromae</i> em diferentes formulações de meio.....	69
Tabela 8:	ANOVA obtida para o DCCR 2 ² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de <i>L. theobromae</i> até 96h.....	71
Tabela 9:	Matriz do DCCR 2 ² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por <i>L. theobromae</i> MMBJ, com o incremento entre os tempos de cultivo.....	74
Tabela 10:	Estimativa de efeito da concentração de nutrientes no incremento de EPS e Y _{X/P} entre 72 e 96h de cultivo por <i>L. theobromae</i>	75
Tabela 11:	ANOVA obtida para o DCCR 2 ² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de <i>L. theobromae</i> no incremento entre os tempos 72 e 96h.....	76
Tabela 12:	Meios otimizados para síntese de EPS por <i>L. theobromae</i>	78
Tabela 13:	Resultado da validação do cultivo de <i>L. theobromae</i> em dois meios otimizados.....	79

Tabela 14:	Variação do módulo elástico (G') das amostras de caldo com e sem células em diferentes frequências.....	82
Tabela 15:	Parâmetros reológicos calculados pelos modelos de Ostwald-de-Waele e Herschel Bulkley para caldo fermentado caldo com e sem células.....	83
Tabela 16:	Relação G'/G'' para o caldo sem células ao longo do rampa de temperatura (5~30~5°C).....	85
Tabela 17:	Composição monossacarídica das frações de polissacarídeos PEPS e SEPS, obtidos do EPS produzido por <i>L. theobromae</i> em cultivo submerso.....	87
Tabela 18:	Obtenção de β -glucana-(1→6) por micro-organismos e suas respectivas fontes, em ordem crescente de tamanho de cadeia.....	91
Tabela 19:	Tipos de ligação baseados na análise de acetato de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados obtidos a partir da fração PEPS do <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	93
Tabela 20:	Composição de compostos apolares e carboidratos no micélio de <i>L. theobromae</i> cultivado em diferentes fontes de carbono.....	96
Tabela 21:	Porcentagem de Monossacarídeos presentes nas frações Solúvel em água fria (S) e insolúvel em água fria (P) da Biomassa Seca de <i>L. theobromae</i> cultivada em diferentes Fontes de Carbono.....	97
Tabela 22:	Paralelo entre os parâmetros fermentativos dos cultivos em bioreator e em agitador orbital usando meio otimizado.	104
Tabela 23:	Ajuste matemático da curva de fluxo obtida em viscosímetro (25°C, sensor 18) aos modelos de escoamento de Ostwald-de-Waele e Herschel Bulkley das amostras de caldo fermentado por <i>L. theobromae</i> em bioreator na aeração de 0,8 ou 1,5 vvm. . Para cada tempo de cultivo foi escolhido o modelo matemático que melhor descreveu dados empíricos, marcado em negrito.....	109

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	-alfa
β	-beta
μg	-micrograma
μL	-microlitro
μm	-micrômetro
μP	-velocidade específica de síntese de produto (em h^{-1})
μS	-velocidade específica de consumo de substrato (em h^{-1})
μX	-velocidade específica de síntese de biomassa seca (em h^{-1})
$\dot{\gamma}$	-taxa de cisalhamento (em s^{-1})
γ	-deformação
δ	-deslocamento químico
η	-viscosidade aparente (em cP)
τ	-tensão de cisalhamento (em m.Pa.s)
τ_0	-tensão inicial para fluxo de Herschel-Bulkley (em m.Pa.s)
χ^2	-Qui-Quadrado
$^{\circ}\text{C}$	-graus Celsius
^1H	-hidrogênio
^{13}C	-carbono treze
$^{13}\text{C-DEPT}$	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
ANOVA	-Análise de variância
ARRT	-Açúcares Redutores Residuais Totais
ART	-Açúcares Redutores Totais
BaCO_3	-carbonato de bário
BDA	-meio ágar dextrose batata
$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	-piridina
\bar{C}_{AL}	-concentração de O_2 no equilíbrio após retomada aeração teste de k_{LA}
C_{AL1} e C_{AL2}	-concentração de O_2 nos tempos t_1 e t_2 do teste de consumo
CH_3COOH	-ácido acético
CH_3I	-Iodeto de metila
CHCl_3	-clorofórmio
cm	-centímetros
COSY	- <i>Correlation NMR Spectroscopy</i>
cP	-centipoise, unidade de viscosidade equivalente a 1 mPa.s
CR	-“ <i>constant shear rate</i> ”, taxa de cisalhamento constante, em inglês
CuSO_4	-sulfato de cobre
d	-desejabilidade dos resultados do DCCR
D_2O	-água deuterada
DCCR	-Delineamento Central Composto Rotacional
D-glucana	-monômero de glicose na conformação D
DMSO	-dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	-dimetilsulfóxido deuterado
dn/dc	-variação do índice de refração em relação à concentração
EPS	-exopolissacarídeo (s)
g	-força G, força centrífuga relativa

g/g	-relação grama por grama
g/L	-gramas por litro
g/Lh	-gramas por litro hora, unidade de velocidade instantânea e de produtividade, padrões cinéticos de fermentação
G'	-módulo de cisalhamento dinâmico elástico
G''	-módulo de cisalhamento dinâmico viscoso
Gal	-galactose
GC-MS	-Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
gl	-graus de liberdade
Glc	-glucose
h	-hora(s)
h ⁻¹	-hora recíproca, unidade de k _L a e da velocidade específica no cultivo
H ₂ SO ₄	-ácido sulfúrico
HCl	-ácido clorídrico
HPSEC	-Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
HSQC	- <i>"Heteronuclear Single Quantum Correlation"</i>
Hz	-hertz
IPS	-polissacarídeo intracelular
K _{HB}	-índice de consistência do modelo de Herschel-Bulkley
k _{La}	-coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
KOH	-hidróxido de potássio
K _{OW}	-índice de consistência do modelo de Ostwald-de-Waele
LBBio	-Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos
m/z	-relação massa e carga
Man	-manose
mg/mL	-miligramas por mililitro
min	-minuto(s)
mL	-mililitros
mm	-milímetros
MMSV	-meio mínimo de sais de Vogel
mPa.s	-milipascal segundo (ou 1 cP), unidade de viscosidade
MSR	-Metodologia Superfície de Resposta
M _w	-peso molecular médio
n	-índice de comportamento de fluido
N ₂	-gás nitrogênio
Na ₂ SO ₄	-sulfato de sódio
NaBD ₄	-boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	-boroidreto de sódio
NaCl	-cloreto de sódio
NaIO ₄	-periodato de sódio
NaN ₃	-azida sódica
NaNO ₂	-nitrito de sódio
NaNO ₃	-nitrato de sodio
NaOH	-hidróxido de sódio
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
(NH ₂) ₂ CO	-uréia
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-fosfato de amônio dibásico
NH ₄ NO ₃	-nitrato de amônio
nm	-nanômetro

O ₂	-gás oxigênio
OD	-oxigênio dissolvido
P _p	-produtividade de EPS(em g/Lh)
P _x	-produtividade de biomassa seca (em g/Lh)
p	-piranose
P	-produto
P-	-fração insolúvel do congelamento e degelo
p/p	-relação peso e peso
p/v	-relação peso e volume
PEPS	-fração do EPS de <i>L. theobromae</i> insolúvel em água fria
PEPS-SM	-fração de PEPS tratada com periodato de sódio
pH	-potencial hidrogeniônico
ppm	-parte por milhão
p-valor	-nível descritivo do teste estatístico
q _{ox}	-taxa de consumo de oxigênio
r _p	-velocidade instantânea de síntese de produto(em g/Lh)
r _s	-velocidade instantânea de consumo de substrato(em g/Lh)
r _x	-velocidade instantânea de síntese de biomassa(em g/Lh)
R ²	-coeficiente de determinação
RMN	-ressonância magnética nuclear
RMN - ¹ H	-ressonância magnética nuclear de próton
RMN- ¹³ C	-ressonância magnética nuclear de carbono treze
rpm	-rotações por minuto
s	-segundo(s)
S	-substrato (fonte de carbono usada no cultivo)
S-	-fração solúvel do congelamento e degelo
SEPS	-fração do EPS de <i>L. theobromae</i> solúvel em água fria
SEPS 005R	-fração de SEPS retida na membrana de 0,05 μm de poro
SEPS 10E	-fração de SEPS retida na membrana de 0,05 μm de poro
SQ	-soma dos quadrados
SQR	-soma dos quadrados dos resíduos
t1 e t2	-tempos distintos de coleta de dados para determinação k _{La}
TCA	-ácido tricloroacético
TFA	-ácido trifluoroacético, CF ₃ COOH
UFPR	-Universidade Federal do Paraná
v/v	-relação volume e volume
VGA	-meio Vogel Ágar
vvm	-volume de ar por volume de meio por minuto
X	-biomassa
X1	-variável “concentração de sacarose comercial” do DCCR
X2	-variável “concentração de nitrato de amônio” do DCCR
Xyl	-xilose
Y _{p/s}	-fator de conversão peso de substrato em produto (adimensional)
Y _{x/p}	-relação de peso de biomassa e de produto (adimensional)
Y _{x/s}	-fator de conversão peso de substrato em biomassa (adimensional)

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$).....	45
Equação 2: Conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$).....	45
Equação 3: Razão Biomassa/produto ($Y_{X/P}$).....	45
Equação 4: Produtividade de biomassa (P_X).....	58
Equação 5: Produtividade de produto (P_P).....	58
Equação 6: Velocidade instantânea de síntese de biomassa (r_X).....	58
Equação 7: Velocidade instantânea de síntese de produto (r_P).....	58
Equação 8: Velocidade instantânea de consumo de substrato (r_S).....	58
Equação 9: Velocidade específica de síntese de biomassa (μ_X).....	58
Equação 10: Velocidade específica de síntese de produto (μ_P).....	58
Equação 11: Velocidade específica de consumo de substrato (μ_S).....	58
Equação 12: Razão SEPS:PEPS.....	58
Equação 13: Velocidade específica de respiração (q_{Ox}).....	59
Equação 14: Equação para cálculo do k_{La}	59
Equação 15: Modelo reológico de Ostwald-de-Waele	61
Equação 16: Modelo reológico de Herschel-Bulkley	61
Equação 17: Equação matemática modelagem de Biomassa em 72 h no DCCR 2^2	68
Equação 18: Equação matemática modelagem de EPS em 72 h no DCCR 2^2	68
Equação 19: Equação matemática modelagem de $Y_{X/S}$ em 72 h no DCCR 2^2	68
Equação 20: Equação matemática modelagem de Biomassa em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 21: Equação matemática modelagem de EPS em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 22: Equação matemática modelagem de [ART] consumido em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 23: Equação matemática modelagem de $Y_{X/S}$ em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 24: Equação matemática modelagem de $Y_{P/S}$ em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 25: Equação matemática modelagem de $Y_{X/P}$ em 96 h no DCCR 2^2	73
Equação 26: Equação matemática modelagem de Biomassa no incremento no DCCR 2^2	77
Equação 27: Equação matemática modelagem de EPS no incremento para DCCR 2^2 ...	77
Equação 28: Equação matemática modelagem de $Y_{X/S}$ no incremento para DCCR 2^2 ...	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Polissacarídeos	25
2.2	β -Glucanas	26
2.3	Polissacarídeos fúngicos mais estudados	26
2.3.1	Exopolissacarídeos (EPS)	27
2.3.2	Polissacarídeos de parede celular	29
2.4	O fungo filamentosso <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	31
2.5	Cultivo submerso de fungos filamentosos	33
2.5.1	Otimização de Processos: exemplo do Delineamento Experimental Rotacional.....	35
2.5.2	Desafios no transporte de matéria em cultivos submersos de fungos filamentosos	36
2.5.3	Reologia de Processos e Morfologia celular de fungos em cultivo submerso	39
3	OBJETIVOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Cultivo submerso de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> para produção de EPS	43
4.1.1	Micro-organismo	43
4.1.2	Pré-inóculo	43
4.1.3	Produção de EPS em Frascos Agitados	44
4.1.4	Separação e determinação da concentração de EPS obtido no caldo de fermentação	44
4.1.5	Separação e determinação da concentração de biomassa obtida no caldo de fermentação	44
4.1.6	Determinação de açúcares redutores residuais totais (ARRT)	45
4.1.7	Cálculo de coeficientes de rendimento do processo fermentativo	45
4.2	Efeito das diferentes Fontes de Carbono	45
4.3	Efeito de diferentes Fontes de Nitrogênio	45

4.4	Estudo da Concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	46
4.4.1	Análises Estatísticas	47
4.5	Comportamento Reológico – Regime Oscilatório	48
4.6	Caracterização de Propriedades Químicas e Estruturais do EPS de <i>L. theobromae</i>	49
4.6.1	Separação dos diferentes exopolissacarídeos de <i>L. theobromae</i> pelo método de congelamento e degelo	49
4.6.2	Purificação dos polissacarídeos por ultrafiltração e por diálise em membranas	50
4.6.3	Análise estrutural dos polissacarídeos	50
4.6.3.1	Composição monossacarídica dos polissacarídeos	50
4.6.3.1.1	Hidrólise ácida total	50
4.6.3.1.2	Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise	50
4.6.3.1.3	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	51
4.6.3.2	Teste de Homogeneidade da amostra e determinação da peso molecular das frações de polissacarídeo	51
4.6.3.3	Avaliação do tipo de ligação glicosídica das frações isoladas de polissacarídeos	52
4.6.3.3.1	Hidrólise para formar os produtos parcialmente <i>O</i> -metilados	52
4.6.3.3.2	Degradação controlada de Smith	52
4.6.3.3.3	Ressonância Magnética Nuclear	52
4.6.3.3.4	Metilação de polissacarídeos	53
4.7	Avaliação dos componentes da biomassa obtida no cultivo de <i>L. theobromae</i> em diferentes fontes de carbono	53
4.7.1	Extração de compostos apolares com clorofórmio-metanol	53
4.7.2	Extração de carboidratos por solução alcalina à quente	53
4.7.3	Purificação das frações de carboidratos presentes na biomassa fúngica de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> pelo método de congelamento e degelo	54
4.8	Produção de EPS em Bioreator de Bancada	54
4.8.1	Descrição do equipamento	54
4.8.2	Condições de cultivo	56

4.8.3	Análise da morfologia do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> cultivado em bioreator	56
4.8.4	Influência da Aeração na biosíntese de EPS pelo fungo filamentoso <i>L. theobromae</i>	57
4.8.5	Cálculo de Coeficientes do processo fermentativo	57
4.8.6	Determinação das razão entre as glucanas SEPS e PEPS no cultivo em bioreator em diferentes aerações	58
4.8.7	Determinação do Consumo de O ₂ em Bioreator de Bancada	59
4.8.8	Método dinâmico para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em bioreator de bancada no cultivo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	59
4.8.9	Comportamento Reológico – Regime Estacionário	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Estudo da produção de EPS por <i>Lasiodiplodia theobromae</i> em frascos Agitados	62
5.1.1	Efeito de diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio na produção de EPS ..	62
5.1.2	Estudo da influência da concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) na produção de EPS por <i>L. theobromae</i>	64
5.1.3	Avaliação reológica em regime oscilatório do caldo fermentado cultivado em agitador orbital	80
5.1.4	Caracterização estrutural e química do EPS produzido por <i>L. theobromae</i>	86
5.1.5	Avaliação dos compostos biomassa de <i>L. theobromae</i> cultivada em diferentes fontes de carbono	95
5.2	Estudo da produção de EPS por <i>Lasiodiplodia theobromae</i> em bioreator ..	101
5.2.1	Influência da aeração na morfologia celular de <i>L. theobromae</i> cultivado em bioreator	101
5.2.2	Influência da aeração na produção de EPS, nos parâmetros fermentativos, no consumo de O ₂ e na síntese de glucanas	101
5.2.3	Avaliação reológica em regime estacionário do caldo fermentado ao longo o cultivo de <i>L. theobromae</i> em bioreator em diferentes volumes de aeração	106

6 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	130

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos e podem ser encontrados em vegetais, algas e fungos. Por muito tempo esses biopolímeros foram explorados por suas características espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, entre outras (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). No entanto, notou-se que algumas dessas moléculas apresentavam também propriedades biológicas, como capacidade antinociceptiva, antiinflamatória, pró-inflamatória e antitumoral (CLEARY; KELLY; HUSBAND, 1999; CUI et al., 2013; KIMURA et al., 2006; MÄKELÄINEN et al., 2007; NOVAK; VETVICKA, 2008; SMIDERLE et al., 2008, 2011; SUN et al., 2013; WASSER, 2002). Desde então, a busca por carboidratos dessa natureza tem recebido atenção de pesquisadores na área médica, de biotecnologia e de engenharia química.

A presença de polissacarídeos em células de micro-organismos vem sendo reportada na literatura por muitos autores (BOWMAN; FREE, 2006; CARBONERO et al., 2006b; CHAPOT-CHARTIER et al., 2010; CHEN et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2013; FONTAINE et al., 2000; GRÜN et al., 2005; MOUZYNA et al., 2005; NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998; NOVAK; VETVICKA, 2008; OSHEROV; YARDEN, 2010; PÉREZ; RIBAS, 2004; SILVA et al., 2008; SMIDERLE et al., 2011, 2012) que destacam, principalmente, sua estrutura química e atividade biológica. Glucanas, polissacarídeo formado por glicose, vêm recebendo muita atenção por diversos grupos de pesquisa devido suas propriedades imunomoduladoras (NOVAK; VETVICKA, 2008; PALIĆ et al., 2006; SMIDERLE et al., 2011, 2013), mediadoras da resposta da insulina à glicose na circulação sanguínea (CHEN; RAYMOND, 2008; MÄKELÄINEN et al., 2007; REGAND et al., 2011), antitumorais e antimetastáticas (HARNACK et al., 2009; KIMURA et al., 2006; UKAWA; ITO; HISAMATSU, 2000). Várias dessas moléculas bioativas são encontradas em cogumelos, como componentes de sua parede celular (BHANJA et al., 2012; CARBONERO et al., 2006b; KIHIO et al., 1992; MAJI et al., 2012; MIZUNO, 1999; ROUT et al., 2005; SANTOS-NEVES et al., 2008; SMIDERLE et al., 2011). Embora seja obtida em cultivos submersos, a biomassa de *L. theobromae* tem sido tratada como resíduo do processo, e a composição de sua ainda não havia sido estudada.

A obtenção de polissacarídeos com essas propriedades esteve, por algum tempo, restrita à purificação de extratos obtidos de cogumelos, exigindo etapas de tratamento e separação. A biossíntese dessas mesmas moléculas por cultivo submerso de micro-organismos apresenta a vantagem de controle de processo para obtenção de produtos em lotes

homogêneos, sem influência de sazonalidade ou safra e, no caso de exopolissacarídeos (EPS), a purificação se torna mais simples e rápida, exigindo um número menor de operações unitárias(MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

No entanto, o desenvolvimento de um bioprocesso usando micro-organismos envolve seleção da cepa produtora (DONOT et al., 2012; POLI et al., 2011; SEVIOUR et al., 2011; mSUTHERLAND, 1998), de fontes de nutrientes (JOSHI et al., 2012; LIN; CHEN, 2007; PAPANUTTI, 2010), de formulação de meio fermentativo (DESAI et al., 2008; DUTA; FRANCA; LOPES, 2006; MAJUMDER; SINGH; GOYAL, 2009), do modo de condução do cultivo (BHARGAVA; WENGER; MARTEN, 2003; BHARGAVA et al., 2005; GARCIA-SOTO et al., 2006), do tipo de bioreator (STASINOPOULOS; SEVIOUR, 1992), de agitação e taxa de aeração (ALBAEK et al., 2011; BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; PARK et al., 2002a, 2002b; ROUKAS; MANTZOURIDOU, 2001) e da escolha da pá agitadora mais adequada (ALBAEK et al., 2011; DRONAWAT; SVIHLA; HANLEY, 1997; FUENTE; CHOPLIN; TANGUY, 1997; KUMARESAN; JOSHI, 2006)para síntese de produto de maneira economicamente viável.

A ampliação de escala de cultivos submersos usando fungos filamentosos apresenta particular dificuldade na distribuição de oxigênio em cultivos aerados, pois as propriedades físicas do caldo de cultivo se modificam ao longo do tempo pela variação da morfologia celular, e da concentração de produto, de células e nutrientes (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; GRIMM et al., 2005). As características reológicas do cultivo submerso de *L. theobromae* ainda não foram investigadas. Esse estudo pode contribuir para o aumento de escala de bioprocessos usando fungos filamentosos.

Lasiodiplodia theobromae é um fungo fitopatogênico produtor de exopolissacarídeos. A estrutura química desse EPS ainda não foi completamente elucidada, embora Cunha e colaboradores (2012)tenham indicado a presença de glucanas no EPS obtido em meio complexo. Estruturas como β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 6)-glucanas foram reportadas no EPS de *Botryosphaeria rhodina*, forma teleomorfa de *L. theobromae* (SELBMANN; STINGELE; PETRUCCIOLI, 2003; VASCONCELOS et al., 2008). Definir as estruturas químicas dos polissacarídeos presentes nesse EPS permitem definir aplicações para essas moléculas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos apresentam propriedades muito importantes para diversos segmentos industriais, como a propriedade de reter moléculas de água, formando soluções coloidais e controlar, desse modo, a atividade de água de um sistema. Gomas, mucilagens ou ainda polissacarídeos solúveis em água, são algumas das denominações desses polissacarídeos que têm a capacidade de formar géis ou soluções viscosas, isto é, têm a função de agentes espessantes ou gelificantes e estabilizantes de emulsões (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Todas estas propriedades são diretamente dependentes das características químicas, físicas e estruturais de cada polímero, como peso molecular (número de unidades por molécula), configuração anomérica (α ou β), conformação (linear, ramificada, helicoidal, agregação entre cadeias), presença de grupamentos (carboxila, entre outros), tipo e grau de substituição dos monômeros, posição das ligações glicosídicas entre os resíduos, entre outras. Desta forma, a caracterização química dos polímeros é necessária para o direcionamento de suas aplicações industriais (EL-ENSHASY, 2007; FARIÑA et al., 2001; FREITAS; ALVES; REIS, 2011; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; POLI et al., 2011; STONE, 2009; ZHANG; KIM, 2012).

As principais fontes de polissacarídeos para aplicações industriais atualmente são as algas marinhas (ex. ágar, carragenana) ou os vegetais pela extração de tubérculos ou cereais (ex. amido), de frutos (ex. pectina), de sementes (ex. goma guar) e de exsudato de plantas (ex. goma arábica e tragacante) (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Os polissacarídeos de origem microbiana têm sido objeto de intensa pesquisa, pois apresentam propriedades espessantes similares ou superiores aos de origem vegetal e de algas. Alguns deles também formam géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações e, em alguns casos, esses polímeros são utilizados como substratos para desenvolvimento de novos produtos, por exemplo, após uma derivatização química (BRANDI, 2011; RAU, 2004; WASSER, 2002).

Os polissacarídeos produzidos por micro-organismos 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 (EPS), polissacarídeos que são excretados para o meio extracelular como cápsulas ou biofilme (DONOT et al., 2012).

2.2 β -Glucanas

Glucanas são homopolímeros de glicose, geralmente com alto peso molecular, e são classificados de acordo com o tipo de ligação entre os resíduos de glicose e a conformação anomérica desses monossacarídeos. β -glucanas são polímeros de glicose em conformação beta e são encontrados em diversos organismos, como plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (AHMAD et al., 2010; HARRIS; STONE, 2009; MCINTOSH; STONE; STANISICH, 2005).

A estrutura das glucanas obtidas de fungos são pré-requisitos para seu papel fisiológico na parede celular de fungos, bem como em suas características físicas, químicas e biológicas. A diversidade estrutural das glucanas fúngicas permite investigar novos agentes com potenciais qualidades para vários segmentos da indústria, como alimentício, farmacêutico, de combustíveis, de plásticos biodegradáveis e outros (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

As β -glucanas são a forma predominante das glucanas produzidas por fungos, com ligações β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) (GORIN; SPENCER, 1968; HARRIS; STONE, 2009; LATGÉ, 2010). Esses carboidratos são obtidos tanto em EPS quanto nos extratos alcalinos e aquosos de corpos de frutificação (BERNARD; LATGÉ, 2001; CARBONERO et al., 2006a; CLEVAUD; AIMANIANDA; LATGE, 2009; FONTAINE et al., 2000; HARRIS; STONE, 2009; LATGÉ, 2010; STONE, 2009; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

2.3. Polissacarídeos fúngicos mais estudados

Grande número de trabalhos tem interesse nos carboidratos da parede celular de fungos (CHEN et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2012; KIM; YUN, 2006; OSHEROV; YARDEN, 2010; SILVA et al., 2008; SMIDERLE et al., 2011; TAKAHASHI et al., 1995). Outros grupos têm se ocupado na seleção de novos produtores de EPS e sua caracterização (DI CAGNO et al., 2006; FONSECA-GARCÍA et al., 2011; PAPINUTTI, 2010; POLI et al., 2011; ZHU et al., 2012) bem como a otimização do processo de produção (DESAI et al., 2008; DHANDHUKIA; THAKKAR, 2008; GAO et al., 2012; HE et al., 2012; JOSHI et al., 2012; KOCHARIN et al., 2010; LIU; WANG, 2007; MAJUMDER; SINGH; GOYAL, 2009).

Tamanho interesse nos polissacarídeos provenientes de fungos se deve a estudos mostrando aplicações biológicas, além daquelas já exploradas dos polissacarídeos obtidos de vegetais. Além disso, o “upstream” e “downstream” para obtenção de polissacarídeos microbianos é mais simples, e permite obtenção de grande quantidade em um curto espaço de tempo.

A atividade antitumoral, por exemplo, é exibida por uma variedade de polímeros, desde homopolissacarídeos até os heteropolímeros mais complexos (OOI; LIU, 1999). As diferenças na atividade podem estar relacionadas na solubilidade em água, no tamanho das moléculas e na frequência das ramificações. Modificações químicas são freqüentemente usadas para mudar as propriedades das glucanas extraídas de fungos, para obter derivados solúveis em água. Apesar de ser complicado relacionar estrutura e atividade antitumoral em carboidratos complexos, algumas relações podem ser inferidas. Está claro, por exemplo, que glucanas com ligações tipo β -(1 \rightarrow 3) na cadeia principal e ramificações tipo β -(1 \rightarrow 6) são necessárias para atividade antitumoral. β -glucanas contendo principalmente ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) tem menor atividade. Glucanas de alto peso molecular, no entanto, parecem ter atividade biológica mais efetiva que cadeias de menor massa (MIZUNO, 1996, 1999).

A aplicação terapêutica parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (COLLEONI-SIRGHIE, 2003; MUELLER et al., 2000; OOI; LIU, 1999). Atividades biológicas como redução dos níveis de colesterol em sangue humano, aumento da excreção de lipídeos e estimulação do sistema imune contra neoplasias (atividade antitumoral) e doenças microbianas estão freqüentemente associados a esses polissacarídeos (CHEN; RAYMOND, 2008; MÄKELÄINEN et al., 2007; WASSER, 2002).

2.3.1. Exopolissacarídeos (EPS)

Os polissacarídeos podem ser classificados como homopolímeros (polímeros com um único tipo de monossacarídeo em sua cadeia) ou heteropolímeros (polímeros com mais de um tipo de monossacarídeo em sua cadeia). Essas cadeias podem ter diferentes seqüências de monômeros em sua estrutura, mas também diferentes seqüências de ligações glicosídicas e diferentes padrões de ramificação (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Dentre os três tipos de polissacarídeos, os EPS apresentam vantagens sobre os polissacarídeos intracelulares (IPS) e os de parede celular, incluindo grande produção em menos tempo e a facilidade de separação e purificação (LIU; ZHANG, 2007; SHIH; PAN; HSIEH, 2006).

Muitos micro-organismos têm habilidade de produzir EPS como biopolímeros insolúveis ou solúveis. A capacidade de produção de EPS está distribuída amplamente entre os fungos e muitos dos EPS produzidos são β -glucanas altamente higroscópicas, sugerindo que essa produção pode estar relacionada com a tolerância à desidratação (SELBMANN;

STINGELE; PETRUCCIOLI, 2003). Em fungos de podridão branca a produção de EPS pode estar relacionada ao processo de degradação de materiais celulósicos (VESENTINI; DICKINSON; MURPHY, 2007).

No momento, um grande interesse está focado nos exopolissacarídeos fúngicos e sua produção (GAO et al., 2012; HE et al., 2012; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; PAPANUTTI, 2010; POLI et al., 2011; XIANG; XU; LI, 2012). Esses polissacarídeos, tanto pertencentes à parede celular como os extracelulares, têm sido investigados por apresentarem uma variedade de respostas biológicas, tais como atividade antitumoral, antiinflamatória e imuno-moduladora (CHEN; RAYMOND, 2008; CHEN; SEVIOUR; RAMSDALE, 2007; ENGSTAD et al., 2002; HARNACK et al., 2009; KIMURA et al., 2006; MÄKELÄINEN et al., 2007; NOVAK; VETVICKA, 2008; PALIĆ et al., 2006; REGAND et al., 2011; UKAWA; ITO; HISAMATSU, 2000).

A produção de EPS microbianos não está sujeita às alterações climáticas, à contaminação marinha ou à problemas nas colheitas, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais (FREITAS; ALVES; REIS, 2011; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; SEVIOUR et al., 2011). São, ainda, menos susceptíveis à variabilidade em suas propriedades químicas e físicas, mantendo o padrão de qualidade, pois diferentes parâmetros de produção (como pH, temperatura, aeração e cisalhamento sobre o caldo) podem ser controlados cuidadosamente. Além disso, frações de EPS contêm concentrações mais altas de carboidrato, quando comparado ao conteúdo nos extratos obtidos de plantas ou de corpos de frutificação. Assim as fases de purificação podem ser de menor custo e menos numerosas, além de apresentarem dificuldades menores (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Existem, ainda, técnicas de genética molecular para manipular microorganismos e permitir obtenção de polissacarídeos microbianos com propriedades específicas, as quais ainda não são facilmente obtidas por vegetais (HARADA et al., 1996; MEYER, 2008).

Alguns trabalhos têm reportado a produção de diferentes polissacarídeos microbianos em uma mesma condição de cultivo. Osaku e colaboradores (2002) obtiveram quatro diferentes EPS, produzidos por *Thelephora terrestris*, sendo duas mananas e duas glucanas com diferentes estruturas. Pokhrel e Ohga (2007) obtiveram dois diferentes polissacarídeos (um EPS e um IPS), no cultivo de *Lyophyllum decastes*. Lee e colaboradores (2004) descreveram polissacarídeos de três diferentes pesos moleculares (sua estrutura não foi determinada) sendo dois EPSs e um IPS, no cultivo submerso de *Grifola frondosa* em meio contendo glicose (30 g/L). Alguns autores também encontraram apenas um polissacarídeo em

cultivos submersos. Barbosa e colaboradores (2003) caracterizaram o EPS produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em frascos agitados como sendo uma única estrutura, uma glucana do tipo β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6). Em outro trabalho, Vasconcelos e colaboradores (2008) cultivaram quatro diferentes cepas do mesmo fungo em uma mesma formulação de meio de cultivo. A cepa isolada de graviola (MMGR) produziu um exopolissacarídeo do tipo β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucana, enquanto que os outros isolados (de manga, pinha e laranja) produziram glucana do tipo β -(1 \rightarrow 6). Cunha e colaboradores (2012) reportaram a obtenção de 7 g/L de uma única glucana, produzida pela cepa MMPI de *Lasiodiplodia theobromae* em frascos agitados.

Selbman e colaboradores (2004) realizaram cultivo de *Botryosphaeria rhodina* (forma teleomorfa de *L. theobromae*) em bioreator de 3L utilizando sais minerais, NaNO₃ (3 g/L) e extrato de levedura (1 g/L) como fontes de nitrogênio, glicose (60 g/L) com pH inicial de 4,7, temperatura de 28 °C, aeração de 1 volume de ar por volume de meio por minuto (vvm) e agitação de 500 rotações por minuto (rpm). Obteve-se um aumento da produção do EPS desse fungo (denominado posteriormente como botriosferana) em relação ao cultivo em frascos agitados, de 16 g/L em 24 h de cultivo para 25,7 g/L em 22 h de cultivo. Novos cultivos com *B. rhodina* (DABAC-P82) em bioreatores foram descritos em 2007 por Crognale e colaboradores. Foram realizados ensaios comparativos entre cultivos em erlenmeyers de 500 mL com 90 mL de meio de cultivo, mantidos a 150 rpm e 28 °C e cultivos em bioreator de 3 L, com temperatura de 28 °C, aeração de 1,9 vvm e agitação de 600 rpm. Em ambos os ensaios o meio de cultivo era o mesmo empregado por Selbman e colaboradores (2004). Os autores verificaram que a produção da glucana (19,7 e 15,2 g/L, em frascos e bioreator, respectivamente) foi acompanhada pela produção de β -glucanases e β -glucosidases, tanto extracelulares quanto ligadas às células. A redução da viscosidade do meio após 78 h de cultivo provavelmente estaria relacionada à ação hidrolítica destas enzimas sobre a botriosferana. A produção de β -glucanases por *Botryosphaeria rhodina* também foi descrita por Giese e colaboradores (2005).

2.3.2 Polissacarídeos de parede celular

Na parede celular dos fungos, as glucanas presentes estão normalmente associados às proteínas, lipídeos e outros carboidratos, tais como mananas. A função específica da glucana na fisiologia do fungo não está completamente esclarecida, entretanto considera-se que sua principal função estrutural seja auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular (FREE, 2013; KOLLÁR et al., 1995; OSHEROV; YARDEN, 2010; PÉREZ; RIBAS,

2004). Têm-se sugerido que as glucanas extracelulares de fungos ligninolíticos desempenham um importante papel na degradação de lignina, como fonte indireta de peróxido de hidrogênio (KRCMAR et al., 1999). Outra participação deste exopolissacarídeo no metabolismo do fungo, em particular daqueles que degradam a madeira, seria a de atuar como suporte para a adsorção das enzimas excretadas e, finalmente, acredita-se que o exopolissacarídeo protegeria a hifa da desidratação, bem como regularia a concentração de glicose extracelular (BUCHALA; LEISOLA, 1987).

Alguns pesquisadores têm explorado a caracterização e prospecção das atividades biológicas dos polissacarídeos presentes em micélios fúngicos, de basidiomicetos ou ascomicetos (BHANJA et al., 2012, 2013; CARBONERO et al., 2006a, 2006b; NANDAN et al., 2008; SMIDERLE et al., 2006, 2011, 2012). Até este momento, nenhum estudo procurou identificar a presença ou o tipo de polissacarídeo presente no micélio de *L. theobromae*.

A parede celular da maioria dos fungos e a biossíntese de seus componentes ainda é pouco estudada, principalmente entre os fungos filamentosos (LATGÉ; CALDERONE, 2005). Free (2013) afirma que, mesmo que poucas paredes celulares de fungos tenham sido caracterizadas, é clara a grande diferença nos polissacarídeos usados para construção da parede celular. Ainda de acordo com o autor, é provável que uma composição ainda mais diversa seja encontrada ao investigar células fúngicas em diferentes estágios de desenvolvimento. Dentre os constituintes, podem ser encontrados quitina, glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 3)- β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 3)- β -(1 \rightarrow 6), β -(1 \rightarrow 6), α -(1 \rightarrow 3) e melanina. Esses compostos são encontrados em algumas, mas não em todas as células fúngicas estudadas até hoje (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; LATGÉ, 2010; OSHEROV; YARDEN, 2010). Os polissacarídeos totais da parede celular do fungo podem chegar a compor cerca de 90% em massa, podendo ser divididos em esqueleto fibrilar (insolúvel em soluções alcalinas) e cimento amorfo, que é solúvel em álcali (LATGÉ, 2010).

Os polissacarídeos obtidos a partir basidiomicetos e ascomicetos são, em geral, glucanas (STONE, 2009). Em *Schizosaccharomyces pombe* ou *Aspergillus fumigatus*, os polissacarídeos oriundos do extrato alcalino são compostos de α -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 4)-glucanas, galactomananas com galactopiranosose ou galactofuranose (BEAUVAIS et al., 2005; GRÜN et al., 2005; SUGAWARA et al., 2004). Já em *Saccharomyces cerevisiae*, esse extrato é composto de mananas complexas e β -(1 \rightarrow 3)-glucanas ramificadas, com cadeias laterais tipo β -(1 \rightarrow 6) (MANNERS; MASSON; PATTERSON, 1973; MANNERS et al., 1973). No líquen *Teloschistes flavicans* foram obtidos diferentes polissacarídeos na extração alcalina à quente, tais como: uma glucana com ligações β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) insolúvel em água fria, uma

galactomanana e uma α -glucana com ligações alternadas tipo (1→4) e (1→6), solúvel em água fria (REIS et al., 2002).

2.4 O fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae (Patouillard, Griffon & Maublanc, 1909) é um fungo filamentoso e forma anamorfa do fungo *Botryosphaeria rhodina* (Berk & Curt.), pertencentes à família Botryosphaeriaceae. São fungos fitopatogênicos, causadores da “podridão negra” (“Forest Dieback”, em inglês). Sua capacidade de infectar frutos coloca-o dentre os patógenos mais eficientes disseminados por meio de sementes e causadores de problemas de pós-colheita (MUNIZ et al., 2011). O banco de dados Fungal Database da USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) apresentou, em outubro de 2013, uma lista de 330 espécies vegetais infectadas pelo *L. theobromae* e suas respectivas fontes científicas. Dentre as espécies estavam milho, manga, graviola, caju, berinjela, mamona, maracujá, entre outros. O fungo é típico de regiões tropicais, entre 40° ao norte e ao sul do equador, contemplando, portanto, todo o território brasileiro. Trata-se de um organismo do grupo de risco 1 (“RG-1”), que são aqueles que não causam doenças em adultos humanos saudáveis e tem baixo ou nenhum risco à comunidades, sendo raramente associados à feohifomicoses (queratite micótica, lesões em unhas e em tecido sub-cutâneos) (SUMMERBELL et al., 2004) e pneumonia (WOO et al., 2008) em humanos.

As colônias de *L. theobromae* em cultura pura em meio ágar dextrose batata (BDA) apresentam abundante micélio aéreo, inicialmente branco, passando a cinza escuro e posteriormente a negro. Picnídios são simples ou compostos, freqüentemente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides para elipsóides - oblongos, com parede espessa e base truncada. Os conídios maduros de *L. theobromae* (Figura 1) tornam-se uniseptados e de coloração castanho-amarelados, sendo longitudinalmente estriados. As dimensões destes conídios variam entre 18-30×10-15 μm . Conidióforos quando presentes são hialinos, cilíndricos, algumas vezes septados, tendo mais de 50 μm de comprimento. Células conidiogênicas são inicialmente unicelulares, hialinas, granulosas e subovóides (ABDOLLAZADEH et al., 2010; GURE; SLIPPERS; STENLID, 2005; NOHALI; ENCINAS, 2001; PHILLIPS et al., 2013).

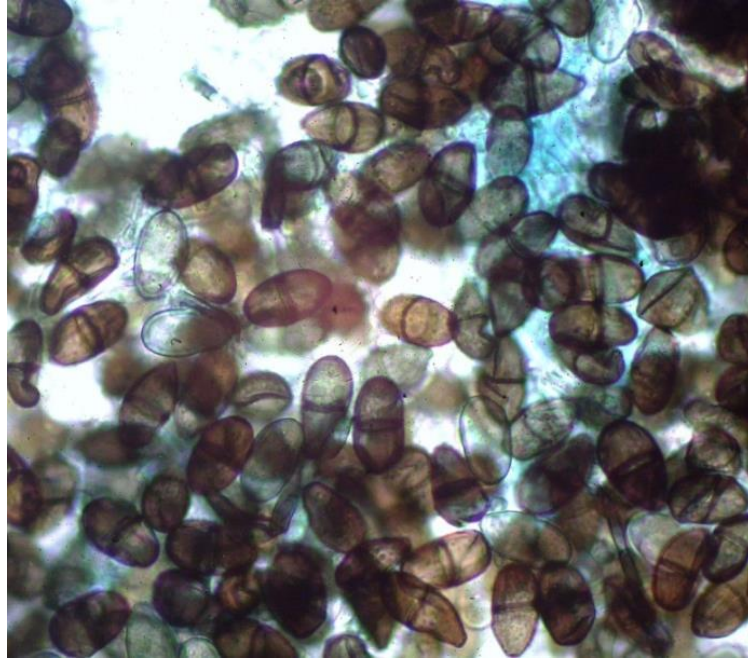


Figura 1: Conídios maduros (de cor castanha) e imaturos (transparentes) de *L. theobromae* retirados de placa com meio BDA. Microscópio ótico, aumento de 400×, corado com azul de bromofenol.

L. theobromae tem se destacado na literatura por sua patogenicidade com várias espécies vegetais de importância econômica (DE WET et al., 2008; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2005; LIMA et al., 2013; MUNIZ et al., 2011) e por sua habilidade de sintetizar o ácido jasmônico, um hormônio vegetal de proteção contra patógenos, em cultivos submersos (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2008; MIERSCH; SCHNEIDER; SEMBDNER, 1991; TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010).

A produção de EPS por *L. theobromae* MMBJ foi estudada em cultivos com diferentes valores de pH inicial. Observou-se que a produção do EPS ocorria em ampla faixa de pH. Com exceção dos cultivos realizados em pHs extremos, como pH 3 e pH 9, todos os demais (desde pH 4 até pH 8) apresentaram máximo de produção com 72 h, verificando-se inclusive valores próximos de recuperação de EPS. Os cultivos iniciados dentro do intervalo de pH entre 4 e 8 apresentaram curvas de crescimento similares, com a máxima produção de EPS ocorrendo durante a fase exponencial de crescimento (MATTOS et al., 2009).

Cunha e colaboradores (2012) cultivaram *L. theobromae* MMPI em frascos agitados e bioreator tipo tanque agitado usando meio contendo glicose e extrato de levedura, analisaram o EPS produzido usando FT-IR e composição monossacarídica após hidrólise, confirmando a presença de uma glucana. Mesmo com grandes rendimentos de EPS (7 g/L em frasco agitado)

o pronunciado crescimento celular desse fungo filamentososo em cultivo submerso (17,2 g/L) acaba consumindo grande parte do substrato oferecido inicialmente ($Y_{P/S}=0,25$ $Y_{X/S}=0,62$). Vasconcelos e colaboradores (2013) modificaram quimicamente a glucana obtida de *Lasiodiplodia theobromae* que apresentou atividade anticoagulante superior à glucana não modificada.

2.5 Cultivo submerso de fungos filamentosos

Diversos produtos importantes são obtidos através de bioprocessos envolvendo cultivo submerso de fungos filamentosos. Dentre eles podemos exemplificar a obtenção de antibióticos (cefalosporina por *Cephalosporium acremonium* e penicilina G por *Penicillium crysogenum*), enzimas (amilase por *Aspergillus oryzae* e hemicelulase por *Trichoderma reesei*) e carboidratos (pululana por *Aureobasidium pullulans* e escleroglucana por *Sclerotium sp.*) (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Novos produtos obtidos pela fermentação de fungos filamentosos vêm sendo descobertos e o estudo da viabilidade desses novos bioprocessos e sua ampliação de escala tem sido assunto bastante explorado na literatura (EL-ENSHASY, 2007; FRANÇOIS et al., 2011; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; MEYER, 2008; PAPAGIANNI, 2004; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; TANG et al., 2007; TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010).

Muitos bioprocessos usando micro-organismos começam na fermentação em frascos pequenos, como os Erlenmeyers, em um equipamento chamado agitador orbital (Figura 2, A). Em seguida, com alguns parâmetros fermentativos já estudados, os cultivos são transferidos para escalas maiores, em bioreatores de bancada. Bioreatores são todos os equipamentos utilizados para converter matérias-primas em produtos utilizando microrganismos, células animais, vegetais ou enzimas. Microrganismos e células devem estar constantemente envolvidos num ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento (SCHMIDELL, et al., 2001). Um bioreator mantém o processo fermentativo usando micro-organismos provendo condições adequadas - como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio - possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (SCHÜGERL, 1987). Embora existam diversos modelos de bioreatores (exemplos na Figura 2, B e C), os mais comumente empregados em cultivos de microrganismos e células, independentemente de escala, são os bioreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e os bioreatores não-convencionais pneumáticos, tipo “coluna de bolhas” e tipo “airlift” (SEVIOUR et al., 2011).

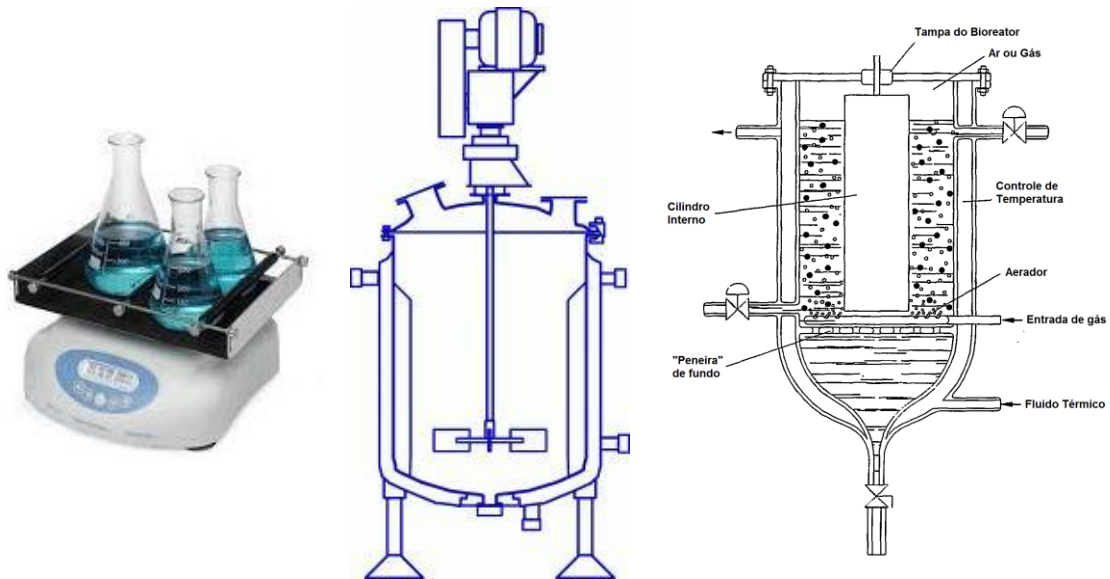


Figura 2: Exemplos de equipamentos utilizados no desenvolvimento de bioprocessos. A) Agitador orbital; B) Esquema de um bioreator do tipo Tanque Agitado; C) Esquema de bioreator do tipo “air-lift”.

A transferência de escala de agitador orbital para bioreator é frequentemente um passo crítico no processo de “scale-up”; e a síntese de moléculas espessantes, como os EPS, tornam essa etapa particularmente complexa (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; SEVIOUR et al., 2011; TANG et al., 2007; ZHONG, 2010). O aumento de escala acarreta diferenças na distribuição de substrato e oxigênio na coluna de líquido. Em agitador orbital o oxigênio é fornecido ao meio de cultivo apenas pela agitação mecânica constante, enquanto que em bioreatores a combinação de agitação mecânica (de pás agitadas mergulhadas no líquido promovendo homogeneização do líquido) e/ou pneumática (injeção de ar ou gás no sistema através de um aerador) pode fornecer oxigênio ao cultivo em diferentes intensidades.

Os cultivos submersos usando micro-organismos podem ser conduzidos em três diferentes modos de operação: Batelada Simples (também chamada descontínua); Batelada Alimentada ou Batelada Contínua. Processos descontínuos são os intermitentes e nele o cultivo só tem início após o preenchimento do fermentador, momento em que se mistura o mosto com o inóculo – contendo células para início da fermentação. Já na batelada alimentada, são acrescentados quantidades de meio de cultivo contendo nutrientes (podem conter apenas fonte de carbono) após a mistura do meio e do inóculo. Trata-se de um método mais produtivo, no entanto as chances de contaminação em uma fermentação de culturas puras são altas. Nos processos contínuos, meio “fresco” é continuamente acrescentado ao

bioreator enquanto o meio contendo células e o produto de interesse são retirados do bioreator para separação e purificação (SCHMIDELL, et al., 2001).

A viabilidade técnico-econômica da produção de EPS não depende apenas da capacidade de produção da linhagem, mas também do desenvolvimento de processos fermentativos utilizando substratos baratos e prontamente disponíveis (CROGNALE; FEDERICI; PETRUCCIOLI, 2003; SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002). No Brasil, o melaço de cana-de-açúcar é frequentemente eleito como alternativa em cultivos de micro-organismos por ser uma matéria prima de baixo custo e nutricionalmente rico. O melaço é um resíduo obtido pela indústria do açúcar e do álcool, e é composto, em média, de 20% de água, 55% de açúcares, 12% de cinzas, 5% de nitrogênio e 8% de outros componentes como esteróis, fosfolípidios e ácidos. Os açúcares são compostos principalmente por sacarose, glicose, frutose e outras substâncias redutoras, entre outros componentes (TECLU et al., 2009).

2.5.1. Otimização de Processos: exemplo do Delineamento Experimental Rotacional

Devido às interações complexas entre a tecnologia de processo, a morfologia das células de fungos filamentosos e o desempenho geral do sistema, algumas otimizações de processo ainda são realizadas da maneira clássica, com etapas demoradas e estratégias empíricas. Alguns produtos adquiridos por fermentação de fungos filamentosos são produtos brutos e, portanto, não estão sujeitos às exigências regulatórias rigorosas. Assim, os fabricantes podem aperfeiçoar continuamente seus processos e cepas para garantir competitividade no mercado. No entanto, a falta de discernimento científico em tecnologia e parâmetros de processos pode levar a processos sub-otimizados e com altas taxas de falha. Por isso, no geral, os Engenheiros de Bioprocessos perseguem a redução do tempo de cultivo a fim de atender as exigências econômicas (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

A maioria dos trabalhos publicados usou técnicas de cultivo submerso para obtenção de EPS e, destes, alguns pesquisadores utilizaram ferramentas estatísticas incluindo Metodologia matriz ortogonal pelo método de Delineamento de Box-Behnken, Delineamento de Plackett-Burman, Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), Redes Neurais ou Delineamento fatorial fracionado (AROCKIASAMY; BANIK, 2008; DESAI et al., 2008; DUTA; FRANCA; LOPES, 2006; JOSHI et al., 2012; LIU; WANG, 2007; MAJUMDER; SINGH; GOYAL, 2009). De acordo com Rodrigues e Iemma (2005) essas metodologias são ferramentas poderosas que podem ser utilizadas para desenvolver ou melhorar um processo, a formulação de um produto avaliando cuidadosamente os efeitos das variáveis independentes

sobre as respostas. Nessas metodologias, mais de uma variável pode ser testada, e seus efeitos sobre as respostas podem ser mensurados e comparados aos erros inerentes do processo.

O DCCR é uma alternativa que possibilita a exploração de todo o espaço amostral com um menor número de ensaios. Este tipo de Delineamento possui um valor de α que o particulariza, pois o mesmo é estabelecido para tornar os coeficientes de regressão ortogonais, ou para dar ao delineamento a propriedade de ser rotacional, isto é, todos os pontos são equidistantes do ponto central (MATEUS, BARBIN e CANAGIN, 2001).

Outra ferramenta muito utilizada na otimização de processos é a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que consiste em técnicas de análise e planejamento de experimentos empregados para modelagem matemática de respostas, ou seja, procura-se identificar o relacionamento que existe entre os fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) do sistema analisado (MYERS e MONTGOMERY, 1995). Este é um método estatístico eficaz para a otimização de variáveis e obtenção do ponto ótimo, sendo amplamente utilizada para otimizar os parâmetros de um processo. Através de um cuidadoso planejamento e análise de experimentos, a MSR busca relacionar uma resposta aos níveis dos fatores. Em geral, a variável resposta é representada por “Y”, e é função de variáveis independentes ou fatores X_1, X_2, \dots, X_k (MONTGOMERY, 2003).

2.5.2. Desafios no transporte de matéria em cultivos submersos de fungos filamentosos

A produção de EPS por fungos filamentosos depende da linhagem utilizada, das condições mantidas durante a fermentação e dos componentes do meio de cultivo. Um número considerável de fungos - incluindo basidiomicetos, fungos filamentosos e leveduras - são conhecidos por sua habilidade de sintetizar EPS em cultivo em laboratório. De um modo geral, a produção de exopolissacarídeos é acompanhada por um aumento notável na viscosidade do meio de cultura ao longo do cultivo, devido ao acúmulo de biopolímero e de crescimento microbiano, resultando em significativo decréscimo na taxa de transferência de oxigênio (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; GARCÍA-OCHOA; CASTRO; SANTOS, 2000; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; ÖZBEK; GAYIK, 2001). No caso da produção de EPS por fungos a dificuldade é ainda maior, pois o crescimento de fungos filamentosos faz o meio de cultura se comportar como fluido não-Newtoniano altamente viscoso (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; BENCHAPATTARAPONG et al., 2005; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994; WANG; MCNEIL, 1995) (BRAUN e VECHT-LIFSHITZ, 1991). O cultivo visando obter EPS de *L. theobromae* é um exemplo de cultivo com aumento de viscosidade (CAMPIONI, 2010).

Para minimizar os problemas de transferência de massa e calor ao longo do processo de fermentação é necessário aumentar a velocidade de agitação, não importando o tipo de agitador usado, ou mudando para agitadores mais apropriados do que a convencional turbina de Rushton (GURA; RAU, 1993; LAZARIDOU et al., 2002; SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2004). Outro ponto crítico que afeta a viabilidade da produção de EPS fúngicos é a interferência das polissacaridases liberadas durante a fermentação. Em cultivos com muitas horas de *A. pullulans* essas enzimas eram, por exemplo, capazes de reduzir o coeficiente de produção de biopolímero até 50% (CAMPBELL; MCDUGALL; SEVIOUR, 2003).

A homogeneização pode ser um fator limitante para distribuição mássica. O cultivo de fungos filamentosos confere uma singular complexidade ao caldo fermentativo, uma vez que os filamentos crescem se desenvolvem desordenada e rapidamente (ALBAEK et al., 2011; BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; FAZENDA et al., 2008; KRULL et al., 2013; RILEY et al., 2000; WUCHERPFENNIG et al., 2010).

Para minimizar os problemas de transferência de massa e calor ao longo do processo de fermentação é necessário aumentar a homogeneidade do caldo fermentativo, aumentando o volume de ar injetado e/ou à velocidade de agitação, não importando o tipo de agitador usado, ou mudando para agitadores mais apropriados do que a convencional turbina de Rushton (BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013; GURA; RAU, 1993; PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2005). O excesso de agitação pode ser nocivo às células em cultivo. Na maioria dos processos químicos, a velocidade de cisalhamento não é um fator a ser considerado, mas em processos bioquímicos, no entanto, esse fator é particularmente importante. O excesso de cisalhamento pode levar à perda de viabilidade celular, até mesmo a sua lise ou influenciar na morfologia e crescimento celular devido às forças hidrodinâmicas (CONTRERAS et al., 1999).

O oxigênio é um componente importante em cultivos submersos usando microorganismos aeróbios. Assim, o volume de ar estéril injetado pode proporcionar diferentes velocidades de assimilação de substrato e síntese de produto, tornando um processo mais viável para a síntese de biomoléculas. Identificar a melhor condição de aeração em um processo fermentativo é fundamental para avaliar parâmetros como o k_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) e, então, fundamentar a ampliação de escala do processo. Em fermentações submersas aeradas, o contínuo fornecimento de oxigênio para as células é fundamental para manter a síntese de produtos e o crescimento celular (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006). A distribuição

de oxigênio em tanques agitados é promovida pela agitação da pá sobre o caldo fermentativo e pelo fornecimento de ar ao meio, através do difusor (“sparger”).

A velocidade de consumo de O_2 por muitos micro-organismos aeróbios é tão alta, que pode consumir todo o oxigênio de uma solução saturada em poucos minutos, comprometendo a produtividade e o rendimento de fermentações industriais (ALBAEK et al., 2011; BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; CHISTI; JAUREGUI-HAZA, 2002; GALACTION et al., 2004; PARK et al., 2002a, 2002b). A velocidade específica de respiração é determinada pelo tipo de micro-organismo, pela composição do meio de cultivo e pelas condições em que são desenvolvidos os processos fermentativos como pH e temperatura (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001). Uma alta velocidade de consumo de oxigênio deve ser igualada por uma velocidade de suprimento se o objetivo é manter a produtividade constante. Logo, a transferência de massa num bioreator deve ser contínua e eficaz de modo a suprir a demanda de oxigênio requerida pelas células.

Observa-se que a partir de uma dada concentração de oxigênio dissolvido, tem-se a velocidade específica de respiração (q_{ox}) constante e máxima. Essa concentração de oxigênio dissolvido é definida como concentração crítica. Logo, se for desejado manter a máxima velocidade de respiração durante um determinado cultivo, deve-se monitorar as condições de agitação e aeração, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido acima do valor crítico (BADINO, 1997). Crueger e Crueger (1993) afirmam que a concentração de oxigênio dissolvido crítica (C_{crit}) situa-se na faixa entre 5 e 25% da concentração de saturação, sendo este valor dependente da forma de crescimento celular e da natureza do caldo de fermentação (viscoso ou não viscoso).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) é uma propriedade dependente principalmente da velocidade do agitador, da aeração testada, da geometria do bioreator e das pás agitadoras, bem como das propriedades do meio de cultivo (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2005; ROUKAS; MANTZOURIDOU, 2001). Assim, determiná-lo se torna fundamental para planejar ampliação de escala em bioprocessos aerados. O k_La , no entanto, depende da característica física do meio de cultivo (dependente da concentração de substrato, de produto e de células), das características do vaso de reação, da composição, tipo e morfologia do micro-organismo e das propriedades de biocatálise. Assim, a determinação do k_La deve ser executada ao longo do cultivo (GALACTION et al., 2004; MARTÍN; MONTES; GALÁN, 2010).

2.5.3. Reologia de Processos e Morfologia celular de fungos em cultivo submerso

O aumento de escala de bioprocessos envolvendo micro-organismos e o estudo de processos de agitação e mistura, do transporte de matéria e de transferência de calor em bioreatores industriais requerem informação sobre propriedades de fluxo de meios nutrientes e meios fermentativos (EDWARDS; BAKER, 1997; JANSSEN et al., 1995).

Reologia se trata do estudo do fluxo e deformação da matéria. Esse ramo da mecânica de fluidos permite definir os materiais como sólidos ou líquidos.

De acordo com Schramm (2006), sólidos ideais se deformam elasticamente, o que significa que a energia necessária para a deformação é completamente recuperada após a tensão ser removida. Define-se fluido como um material que não pode manter a tensão de cisalhamento, τ , ou seja, as forças que atuam no sentido tangencial da superfície. Assim, um fluido irá responder ao cisalhamento deformando-se de forma contínua, ou seja, pelo fluxo. Fluidos ideais deformam-se irreversivelmente e fluem sob ação de uma tensão. A energia requerida neste processo é dissipada em forma de calor e não é recuperada quando a tensão é retirada. Desta maneira, na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade enquanto que nos líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante (TONELI; MURR; PARK, 2005). Entre os dois comportamentos extremos, sólidos e líquidos, existem os materiais que se comportam ora como líquidos ora como sólidos, dependendo da tensão, da frequência ou da temperatura a que são expostos. Esses fluidos denominam-se viscoelásticos (SCHRAMM, 2006).

A viscosidade aparente, η , é o gradiente da velocidade (u) de deslocamento do fluido ao longo da coluna de fluido, ou seja, é a resistência de cada fluido ao cisalhamento (Figura 3).

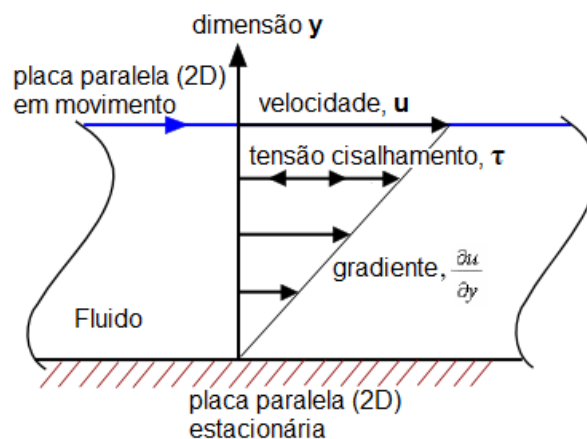


Figura 3: Fluxo de um fluido entre placas paralelas, sendo uma estacionária e outra móvel. O gradiente de velocidade entre as placas é a viscosidade aparente do fluido.

Para fluidos Newtonianos a viscosidade independe da tensão de cisalhamento, ou seja, a viscosidade é constante, enquanto que para fluidos não-Newtonianos a viscosidade é uma função da taxa de cisalhamento. Existem diferentes tipos de comportamento não-newtoniano. O comportamento pseudoplástico é freqüentemente encontrado, e nele a viscosidade diminui enquanto são aplicadas taxas crescentes de cisalhamento. Quando o fluido apresenta viscosidade crescente em função da taxa de cisalhamento é chamado de fluido dilatante. Fluidos pseudoplásticos apresentam índice de comportamento (η) menores que 1, enquanto fluidos dilatantes apresentam η maiores que 1. Soluções poliméricas ou soluções contendo fungos filamentosos são, na maioria das vezes, pseudoplásticas, enquanto que, por exemplo, palha de arroz embebido em água apresenta comportamento dilatante (SCHRAMM, 2006).

Existem modelos matemáticos, como por exemplo os modelos de Herschel-Bulkley e de Ostwald-de-Waele, que relacionam a taxa de cisalhamento à viscosidade e ao índice de comportamento de fluidos não-Newtonianos. Esses modelos têm sido freqüentemente utilizados para descrever o comportamento de fluxo de caldos fermentativos e definir suas características como a pseudoplasticidade, definida por valores de η menores que 1 (RODRÍGUEZ PORCEL et al., 2005; WUCHERPFENNIG et al., 2010).

Nos experimentos oscilatórios podem ser avaliados o caráter sólido ou líquido dos fluidos através dos valores de G' (módulo de armazenamento ou elástico) e G'' (módulo de perda ou viscoso), respectivamente. Quando o módulo elástico (G') é superior ao módulo viscoso (G''), e ambos são independentes da freqüência, o material tem caráter de sólido ou gel forte. Um gel fraco (ou uma solução concentrada) apresenta valores de G'' maiores do que G' em baixas freqüências e, em altas freqüências, ocorre uma inversão dos módulos, com G' maior do que G'' (SCHRAMM, 2006).

A caracterização reológica de fluidos fermentativos tem sido objeto de intensa investigação (COUPER et al., 2005; GABELLE et al., 2012; MOHSENI; KAUTOLA; ALLEN, 1997; RILEY et al., 2000; SEVIOUR et al., 2011; TANG et al., 2007; VAN RIET; VAN DER LANS, 2011; VELJKOVIC; LAZÍĆ; SKALA, 1988) uma vez que determinar as características físicas desse fluido permite dimensionar linhas de produção para condução desse fluido por bombas e tubos entre as etapas de um processo.

As propriedades reológicas mudam durante o cultivo, enquanto as concentrações dos componentes do caldo fermentado (substrato, produto, células microbianas) também variam. Meio nutriente contendo polissacarídeos (substrato ou produto) e micélio exibem, geralmente, comportamento Não-Newtoniano (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; CHHABRA; RICHARDSON, 1999). A maioria dos cultivos usando bactérias ou leveduras

são caracterizados como fluidos newtonianos de baixa viscosidade, onde o fluxo turbulento pode ser facilmente conseguido. O comportamento não-newtoniano de culturas de fungos filamentosos apresenta problemas freqüentes na distribuição de oxigênio, limitando o crescimento celular e a síntese de produto (EL-ENSHASY, 2007; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; GRIMM et al., 2005).

Na fermentação usando fungos filamentosos, a alta concentração de micélio no cultivo submerso de fungos filamentosos traz problemas no desempenho, provocando aumento significativo da viscosidade do meio de cultivo e reduzindo a transferência de matéria. A mudança nas características reológicas do caldo fermentado ao longo do cultivo de fungos se deve ao emaranhamento de células de morfologia filamentosa (WUCHERPFENNIG; LAKOWITZ; KRULL, 2013) e afetam os valores de k_La . Os filamentos tendem a crescer formando redes tridimensionais por acúmulo de biomassa. Essa rede altamente ramificada exhibe diversas interações dinâmicas de fluido, alterando as propriedades iniciais do meio de um fluido Newtoniano para um fluido não-Newtoniano ao longo do processo fermentativo (CHO et al., 2006; SEVIOUR et al., 2011).

Para controlar o desempenho de bioprocessos com fungos filamentosos é essencial saber como as condições de operação influenciam as propriedades reológicas do caldo de cultivo, uma vez que estes dependem também da morfologia celular (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; GRIMM et al., 2005; MEYER, 2008; OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994; RAU et al., 1992). Assim um grande número de trabalhos têm se preocupado em relacionar os fatores ambientais à morfologia fúngica em cultivos submersos (BHARGAVA et al., 2005; GARCIA-SOTO et al., 2006; GRIMM et al., 2005; PAPAGIANNI, 2004; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; REESLEV; JORGENSEN; JOGENSENB, 1996; TANG et al., 2007; THOMAS, 1992; WUCHERPFENNIG et al., 2010). Muitas variáveis foram investigadas, e dentre elas podem ser citados o modo de condução da fermentação, a composição do meio, intensidade de aeração e agitação, o pH inicial do meio, a porcentagem de inóculo, concentração de esporos no inóculo, temperatura, limitação de oxigênio dissolvido e potência na agitação. Os resultados indicam que é fundamental o estudo integrado de morfologia, reologia e cinética para estudo de um bioprocessos usando fungos filamentosos (EL-ENSHASY, 2007; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é definir parâmetros fermentativos em bioreator da fermentação de *Lasiodiplodia theobromae* em meio otimizado para síntese de EPS e caracterizar quimicamente esse produto.

Esse objetivo foi alcançado através dos objetivos específicos:

- Produzir maior quantidade de EPS em agitador orbital usando diferentes fontes de carbono e nitrogênio;
- Otimizar meio de cultivo usando DCCR com os nutrientes previamente selecionados;
- Caracterizar quimicamente os polissacarídeos presentes no EPS produzido;
- Caracterizar os polissacarídeos extraídos da biomassa obtida em cultivo;
- Cultivar o fungo em bioreator, em diferentes aerações, usando meio otimizado;
- Avaliar propriedades reológicas e classificar escoamento dos caldos fermentativos produzidos em agitador orbital e em bioreator;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBio), do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis, sob a orientação da professora Valéria Marta Gomes de Lima.

O fracionamento e as avaliações químicas dos carboidratos isolados foram desenvolvidos junto ao grupo de Química de Carboidratos, do Departamento de Bioquímica da UFPR (Universidade Federal do Paraná) – Campus de Curitiba, sob a coordenação da co-orientadora Lucimara Mach Cortes Cordeiro.

As análises reológicas foram desenvolvidas também junto ao grupo de Química de Carboidratos, do Departamento de Bioquímica da UFPR– Campus de Curitiba, com a colaboração da professora Fernanda Fogagnoli Simas Tosin.

4.1 Cultivo submerso de *Lasiodiplodia theobromae* para produção de EPS

4.1.1 Micro-organismo

A cepa do fungo anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ, isolada de berinjela *Solanum sp*, foi cedida pela professora Dra Aneli de Melo Barbosa para desenvolvimento deste trabalho. Sua sequência parcial foi 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.

4.1.2 Pré-inóculo

A linhagem foi mantida em meio VGA (meio Vogel Ágar), composto de 2% (v/v) de MMSV (meio mínimo de sais de Vogel, 1956), 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar, a 4°C.

Placas contendo meio VGA receberam uma porção de micélio do fungo e, posteriormente, foram incubadas em estufa a 28 °C por um período de 5 a 7 dias.

Após crescimento, 2 discos de 8 mm de diâmetro foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio contendo sais mínimos de Vogel e 0,5 g/L de glicose. O pré-inóculo foi cultivado por 48 h a 28 °C. Após esse período o conteúdo dos frascos foi homogeneizado por 60 s em blender (Pratic Blender, Cadence) previamente higienizado com solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) por 6 h, seguido de uma solução de álcool 70% (p/p) por 12 h. Alíquotas do homogenato foram centrifugadas por 5 min a 4750 rpm (4000 g), a 25°C (Centrífuga Rotina 380R, Hettich). O micélio foi ressuspensionado em solução salina

estéril até que sua absorvância, lida em espectrofotômetro (Biospectro SP220) a 400 nm, apresentasse valores de absorvância entre 0,400 e 0,500 (STELUTI et al., 2004).

4.1.3 Produção de EPS em Frascos Agitados

Uma alíquota (1 mL) da suspensão micelial do pré inóculo (Item 4.1.2) foi transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50mL(2% v/v) de meio para produção de EPS.

Cultivos realizados para caracterização reológica do caldo (Item 4.5) e para caracterização química do EPS (Item 4.6) foram realizados em frascos de 3L, nas mesmas condições de temperatura de agitação. Neles, foram usados 12 mL da suspensão inicial para 600 mL de meio de produção de EPS.

O meio de cultivo padrão para produção de EPS por *L. theobromae* foi composto de sais mínimos de Vogel (1956) contendo NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio e 50 g/L de sacarose. Após crescimento por 72 h o caldo fermentado foi usado para avaliar a concentração de açúcar redutor residual total (ARRT), de EPS e de biomassa fúngica.

4.1.4 Separação e determinação da concentração de EPS obtido no caldo de fermentação

Todo o conteúdo dos frascos, no caso do cultivo em agitador orbital, e as alíquotas de amostragem, no caso das coletas em bioreator, foram centrifugados (Centrífuga Rotina 380R, Hettich) a 4000g por 30 min a 25 °C para separação de biomassa e caldo clarificado.

A biomassa fúngica foi lavada com o mesmo volume de solução salina (0,9% p/v) e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições para extrair polissacarídeos presos entre os filamentos do fungo. O sobrenadante das centrifugações foi utilizado para a obtenção do EPS.

O EPS produzido em cultivo submerso foi precipitado do caldo fermentado pela adição de 3 volumes de álcool etílico (CUNHA et al., 2012). Essa solução etanólica permaneceu em repouso por um período de 24 h para precipitação do EPS, e em seguida foi filtrada. O EPS precipitado foi dialisado (membrana de 2 kDa), concentrado e liofilizado.

A concentração do EPS produzido em cada tempo de cultivo foi calculada pela razão da massa seca de EPS obtida pelo volume de amostra centrifugada.

4.1.5 Separação e determinação da concentração de biomassa obtida no caldo de fermentação

Após centrifugação (como no item anterior) a biomassa precipitada e lavada foi ressuspendida em pequeno volume de água destilada e depositada em filtro de papel de 5,5 cm de diâmetro (Quali, PROLAB, São José dos Pinhais, PR) tarado para secagem a 70°C até peso constante (CUNHA et al., 2012).

A concentração de biomassa fúngica produzida em cada tempo de cultivo foi calculada pela razão de sua massa seca pelo volume de amostra centrifugada.

4.1.6 Determinação de açúcares redutores residuais totais (ARRT)

Após adição de etanol ao caldo e da retirada do polissacarídeo produzido, a solução hidroalcoólica foi concentrada ao volume inicial do caldo e armazenada a -22°C.

Alíquotas das amostras foram hidrolisadas (1:1 v/v de solução de HCl 1 mol/L, por 10 min, a 100°C seguida de neutralização com solução de NaOH 1mol/L) e concentração de ARRT foi determinada pelo método colorimétrico do ácido 3,5 di-nitro-salicílico (MILLER, 1959). Solução de 1 g/L de glicose P.A. foi utilizada como padrão.

4.1.7 Cálculo de coeficientes de rendimento do processo fermentativo

Os valores de conversão de substrato em biomassa, em produto e a razão biomassa/EPS foram calculados de acordo com as Equações 1, 2 e 3.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{BiomassaSeca (g/L)}}{\text{AçúcarConsumido (g/L)}} \quad \text{Equação 1}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{EPSSeco (g/L)}}{\text{AçúcarConsumido (g/L)}} \quad \text{Equação 2}$$

$$Y_{X/P} = \frac{\text{BiomassaSeca (g/L)}}{\text{EPSSeco (g/L)}} \quad \text{Equação 3}$$

4.2 Efeito das diferentes Fontes de Carbono

Para avaliar o efeito de diferentes carboidratos na produção de EPS por *L. theobromae*, foram adicionados ao meio de cultivo Sacarose P.A., Sacarose Comercial, Lactose, Glicose, Frutose ou Melaço na concentração de 50 g/L de açúcares redutores totais (ART). Após crescimento por 72 h o caldo fermentado foi usado para avaliar a concentração de açúcar redutor residual total (ARRT), de EPS e de biomassa fúngica.

O melaço usado, contendo 343 g/L de açúcar redutor total (ART) e 260 mg/L de proteínas solúveis, foi gentilmente cedido pelo Grupo Nova América (Tarumã, SP, Brasil). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.3 Efeito de diferentes Fontes de Nitrogênio

Utilizou-se meio de Vogel e sacarose comercial 50 g/L, acrescido de diferentes fontes de nitrogênio na concentração 0,05 mol de Nitrogênio/L, sendo: nitrato de amônio (NH₄NO₃), nitrato de sódio (NaNO₃), fosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄) e uréia ((NH₂)₂CO). Após

crescimento por 72 h o caldo fermentado foi usado para avaliar a concentração de açúcar redutor residual total (ARRT), de EPS e de biomassa fúngica. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.4 Estudo da Concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (MSR) (RODRIGUES e IEMMA, 2005) foram usados para avaliar a influência da concentração de carbono e nitrogênio na produção de EPS e no crescimento celular, assim como nos fatores de rendimento dos processos fermentativos.

Após a seleção das fontes de carbono e nitrogênio foram executados diferentes DCCRs para otimizar o meio de cultivo para produção de EPS pelo fungo *L. theobromae*.

O pré-inóculo foi preparado como descrito anteriormente (item 4.1.2). Uma alíquota de 1 mL (2% v/v) foi transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio, formulado de acordo com a Tabela 1. Os frascos foram incubados em agitador orbital (180 rpm) a 28°C.

Tabela 1: Matriz do DCCR 2² para estudo da influência da concentração das fonte de carbono (X1) e nitrogênio (X2) no cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para produção de EPS.

Ensaio	X1	X2	X1 (g/L)	X2 (g/L)	
1	-1	-1	42,9	2,3	
2	-1	1	42,9	3,7	
3	1	-1	57,1	2,3	
4	1	1	57,1	3,7	
5	- α	0	40,0	3,0	
6	α	0	60,0	3,0	
7	0	- α	50,0	2,0	
8	0	α	50,0	4,0	
9	0	0	50,0	3,0	
10	0	0	50,0	3,0	
11	0	0	50,0	3,0	
12	0	0	50,0	3,0	
Fatores	Nível Real				
	- α	-1	0	+1	+ α
X1 (sacarose comercial, g/L)	40,0	42,9	50,0	57,1	60,0
X2 (nitrato de amônio, g/L)	2,0	2,3	3,0	3,7	4,0

sendo $\alpha=1,41$

Um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais (α) assim definidos é dito um DCCR. Muitos DCCR têm sido aplicados para avaliar cultivos sob a influência de 2 até 5 variáveis. Sendo k =número de variáveis testadas, num DCCR com dois níveis (+ e -) originais, temos 2^k pontos fatoriais, mais $2k$ pontos axiais e um número arbitrário de pontos centrais. Existem diversas metodologias para escolha do ponto axial (α). Neste trabalho, esse ponto foi escolhido pelo cálculo $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Para duas variáveis, portanto, $\alpha = 1,41$.

X1 e X2 são as variáveis testadas, correspondendo à concentração de carbono (X1) e nitrogênio (X2) no meio de cultivo. Os ensaios (de 1 a 12) correspondiam a meios com diferentes combinações de carbono e nitrogênio, de concentrações mais baixas às mais altas (de $-\alpha$ à $+\alpha$, passando por -1; 0 e +1). As concentrações testadas de nitrogênio foram, da mais baixa para a mais alta, 2; 2,3; 3; 3,7 e 4 g/L.

Foram executados dois DCCR 2^2 idênticos, cada um com 12 corridas, sendo 8 com diferentes formulações de meio de cultivo, e 4 replicatas do ponto central, explorando concentrações de sacarose comercial (entre 40 e 60 g/L) e nitrato de amônio (entre 2 e 4 g/L) na biossíntese de glucanas por *L. theobromae*.

Um total de 24 frascos foi preparado com diferentes formulações de meio, sendo 12 frascos cultivados por 72h e outros 12 por 96h. A temperatura (28°C) e a velocidade de rotação (180 rpm) durante o cultivo permaneceram constantes nesse experimento. Para cada frasco foi avaliados a concentração de biomassa seca, de EPS produzido e ARRT.

Após a otimização da composição do meio de cultivo em frascos agitados, a produção de EPS foi estudada em bioreator de bancada.

4.4.1 Análises Estatísticas

As respostas de cada uma das formulações e em cada DCCR executado foram avaliadas pelos softwares STATISTICA (versão 8.0, Statsoft Inc) e DESIGN EXPERT (versão 6.0, StatEase Inc.).

Para verificar o quanto os modelos matemáticos construídos se ajustavam às respostas observadas foram calculados os valores de Qui-Quadrado (χ^2), Soma dos Quadrados dos Resíduos (SQR) e o Coeficiente de Determinação (R^2). Caso os dados coletados se adequassem por esses parâmetros em um modelo matemático, cada variável era analisada por ANOVA (teste de análise de variância). Ocasionalmente, algumas variáveis não eram significativas para as respostas lidas e, nesses casos, os modelos matemáticos foram reparametrizados apenas com os parâmetros significativos. O intervalo de confiança usado neste trabalho foi de 90%.

Para buscar formulações de meio onde, de acordo com o modelo matemático gerado, as respostas desejadas máximas e/ou mínimas seriam encontradas, foi executado o teste para perfil de desejabilidade (“Desirability Profiles”) através do programa Design Expert (versão 6.0, Statease). Esse perfil representa o quanto das exigências impostas pelos critérios foi alcançado. No programa são escolhidos os critérios de otimização, com a resposta (ou respostas) que se desejava maximizar ou minimizar. Esses critérios devem ser respostas modeladas matematicamente. Para cada critério, são escolhidos meios propostos, e são calculadas suas respostas preditas.

Dentre esses meios são eleitos aqueles que serão submetidos à validação. A validação é o processo fermentativo usando as formulações escolhidas. Após o cultivo, as respostas na condição otimizada são avaliadas, como descrito nos itens anteriores, e comparadas com as respostas preditas pelos mesmos modelos matemáticos previamente determinados. Após a validação, o meio escolhido foi usado no cultivo com *L. theobromae* em bioreator.

4.5 Comportamento Reológico – Regime Oscilatório

O caldo fermentado avaliado em reômetro foi obtido produzido como no item 4.1.3.

No caldo fermentado foram feitos testes de varredura de tensão, varredura de frequência, curva de fluxo e rampa de temperatura utilizando Reômetro HAAKE MARS II acoplado ao sistema de controle de temperatura tipo Peltier, utilizando sensor C60/2°TiL, tipo cone-placa truncado (60 mm de diâmetro, 2° de inclinação e 0,1 mm de truncamento). Para todos os ensaios a distância entre sensor e placa (“gap”) foi de 1 mm. Alíquota de 1 mL foi usada nos experimentos, sempre realizados em quadruplicata, a 25 °C. A cada nova avaliação foram usadas amostras diferentes, para evitar efeito do tempo e do cisalhamento nos fluidos.

Nas curvas de viscosidade, a taxa de cisalhamento variou de 0–500 s⁻¹. As varreduras de tensão (0,01–50 Pa) foram realizadas em frequência fixa de 1 Hz. As varreduras de frequência (0,01–10 Hz) foram realizadas com tensão fixa correspondente à região viscoelástica linear (0,08 ou 0,04 Pa), previamente determinada. Rampas de temperatura foram feitas na faixa de 5–30°C e 30–5°C, com aquecimento/resfriamento na taxa de 2° C/min. Para este experimento, foram fixados 1 Hz de frequência, e a tensão correspondente à região viscoelástica linear. Após atingir a posição de medida, óleo mineral foi adicionado às bordas do sensor para evitar evaporação do solvente durante o aquecimento das amostras. Antes do início dos testes, a amostra permanecia na temperatura inicial por 5 min. A escolha dessa faixa de temperatura se deve à necessidade de avaliar variação das características físicas do caldo fermentado em diferentes temperaturas de armazenamento.

4.6 Caracterização de Propriedades Químicas e Estruturais do EPS de *L. theobromae*

O EPS obtido por cultivo em frascos de 3 L (item 4.1.3) foi extraído (item 4.1.4), filtrado e dialisado contra água destilada em membrana de celulose de 2kDa de poro (Saco de diálise Inlab, São Paulo) “overnight”. O EPS bruto dialisado foi congelado (-22°C) e liofilizado para posterior purificação.

4.6.1 Separação dos diferentes exopolissacarídeos de *L. theobromae* pelo método de congelamento e degelo

A fração de EPS bruto foi purificada por diferentes métodos (Figura 4).

O EPS obtido através da extração alcoólica foi submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984). A mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (16500 g, 15 min, 4°C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso não apresentasse mais precipitado por congelamento e degelo.

As frações solúveis receberam prefixo S em seu nome e as frações insolúveis em água fria receberam o prefixo P.

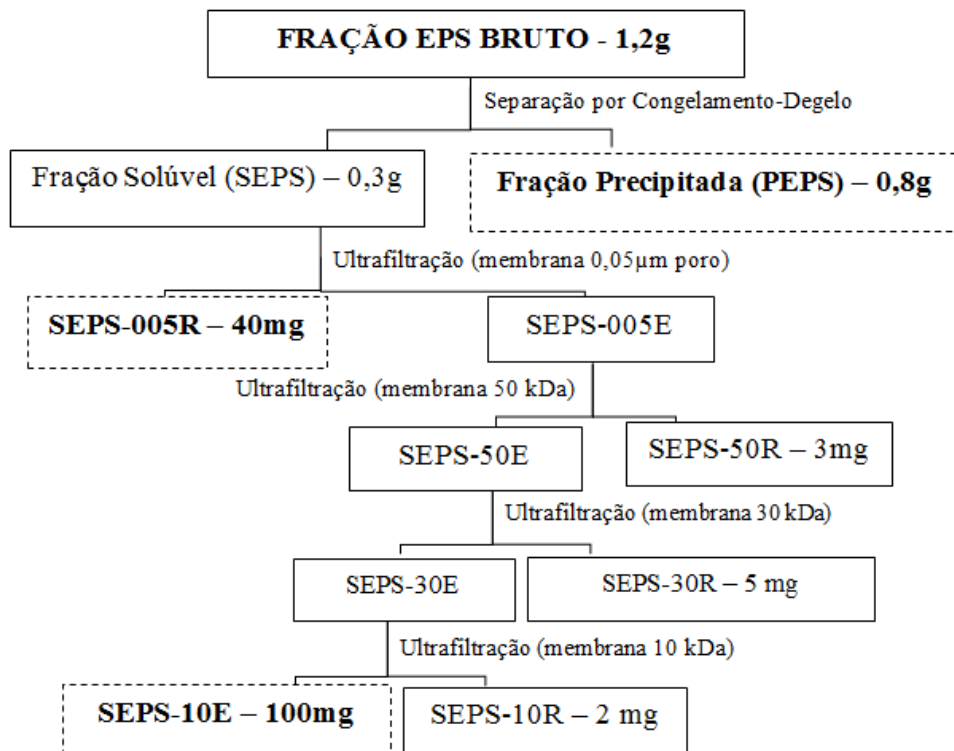


Figura 4: Fluxograma do fracionamento dos EPS produzidos por *Lasiodiplodia theobromae*.

4.6.2 Purificação dos polissacarídeos por ultrafiltração e por diálise em membranas

Para purificação dos polissacarídeos presentes na fração solúvel do EPS obtido no cultivo de *L. theobromae* em agitador orbital, os polissacarídeos foram submetidos à diálise em membranas de celulose regenerada (poros de 2, 5 ou 10 kDa) ou à ultrafiltração em membranas de polietersulfona com tamanhos de poro de 0,05 µm, e também em membranas com limite de exclusão de 50 kDa, 30 kDa e 10 kDa (Millipore®). As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido.

A fração retida nas membranas recebeu sufixo R, enquanto que as frações eluídas receberam o prefixo E.

4.6.3 Análise estrutural dos polissacarídeos

Os polissacarídeos extraídos do EPS de *L. theobromae* ou de sua biomassa (Item 4.7) foram analisados quanto a composição monossacarídica, homogeneidade e peso molecular da amostra, tipo de ligação glicosídica e grau de ramificação das estruturas.

4.6.3.1 Composição monossacarídica dos polissacarídeos

4.6.3.1.1 Hidrólise ácida total

Para determinação da composição monossacarídica, uma alíquota (entre 1 e 2 mg) de todas as frações (Frações SEPS, PEPS e frações de micélio K10S e K10P) foi adicionada de 2 mL de TFA (ácido trifluoroacético 1 mol/L) a 100°C “overnight” (12-15 h). Decorrido o tempo de hidrólise o ácido foi eliminado das amostras por evaporação até secura à temperatura ambiente.

4.6.3.1.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise

Os produtos de hidrólise foram ressuspensos em água e reduzidos com 1 mg de boroidreto de sódio (NaBH₄) à temperatura ambiente, pH 9-10, “overnight” (12-15 h) (WOLFRON, THOMPSON, 1963a). Após esse período as amostras reduzidas foram neutralizadas com ácido acético e levadas à secura sob pressão reduzida. Os acetatos de alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v, 0,2 mL) “overnight” (12-15 h) à temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio, e a piridina residual foi removida por sucessivas adições de solução de sulfato de cobre (CuSO₄) 5% (p/v). Após a remoção total da piridina a fração

clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e filtrada em algodão (adaptado de WOLFRON, THOMPSON, 1963b). Após secura, os acetatos de alditóis isolados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

4.6.3.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados através de GC-MS, utilizando-se um cromatógrafo a gás Varian Sarturn 2000R - modelo 3.800 acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Ion – Trap 2000R) equipados com colunas capilares de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm). Hélio ultra puro foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50 °C (mantida por 1,0 min), seguindo-se de um aumento gradual de 40 °C/min até 210 °C e mantido por 30 min (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou 230 °C e mantido por 15 min (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Os dados foram comparados àqueles identificados pelos típicos tempos de retenção e perfis de fragmentação.

4.6.3.2 Teste de Homogeneidade da amostra e determinação da peso molecular das frações de polissacarídeo

A homogeneidade das amostras foi avaliada por Cromatografia de Exclusão Estérica equipado com um Detector de Índice de Refração modelo Waters 2410.

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) contendo azida de sódio (NaN_3) para atingir uma concentração final de 1mg/mL. As amostras solúveis foram filtradas em membranas de acetato de celulose 0,22 μm (Millipore®). Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel de permeação Waters com limite de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da.

O peso molecular das frações SEPS 10E e SEPS 005R foi determinado usando o valor da taxa de variação do índice de refração em função da concentração (dn/dc) dessa amostra purificada, sendo utilizadas 5 concentrações para cada solução de polissacarídeo.

Para isto, foi preparada uma solução na concentração de 1 mg/mL (em NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 0,2 g/L) de cada uma dessas frações. Em seguida as soluções foram filtradas em membrana de tamanho de poro equivalente a 0,22 μm , sendo então diluídas nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/mL.

4.6.3.3 Avaliação do tipo de ligação glicosídica das frações isoladas de polissacarídeos

4.6.3.3.1 Hidrólise para formar os produtos parcialmente *O*-metilados

Os polissacarídeos per-*O*-metilados foram submetidos à hidrólise total com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (p/v) em banho de gelo por 1 h. A solução foi diluída para 8% pela adição de água destilada e mantida em estufa por 20 h a 100°C. O ácido foi neutralizado com carbonato de bário (BaCO₃) e a amostra foi centrifugada.

Os monossacarídeos per-*O*-metilados presentes no sobrenadante foram reduzidos com boroidreto de sódio deuterado (NaBD₄) e acetilados, como descrito nos itens anteriores. Os produtos metilados e acetilados foram analisados por GC-MS e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SASSAKI et al., 2005).

4.6.3.3.2 Degradação controlada de Smith

150 mg da fração PEPS foram dissolvidos em água e acrescidas de periodato de sódio (NaIO₄) 0,05 mol/L. A solução foi mantida por 72 h sob ausência de luz. O processo de oxidação foi interrompido pela adição de etileno glicol e diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com NaBH₄ (pH 9-10) por 24 h (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). A amostra foi neutralizada com ácido acético, dialisada e submetida à hidrólise ácida parcial (TFA 1 mol/L, pH 2,0, por 120 min sob refluxo em banho com água fervente). Em seguida, o material foi dialisado em membrana de 2 kDa e o material retido foi liofilizado.

4.6.3.3.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN-¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, ¹H/¹³C HSQC ¹H-¹³C e ¹H/¹H foram realizados em espectrômetro BRUKER (modelo Avance-DRX-400).

As análises foram realizadas a 50°C, com as amostras de polissacarídeos (aproximadamente 40 mg), solubilizados 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 ¹³C e ¹H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente, e aos sinais de DMSO-d₆ em δ 39,70 (¹³C) e 2,60 (¹H), para aquelas amostras nesse solvente.

4.6.3.3.4 Metilação de polissacarídeos

Para determinar os tipos de ligação e o grau de ramificação presentes entre os monossacarídeos da fração PEPS, alíquotas desse polissacarídeo foram metiladas pelo protocolo de Ciucanu e Kerek (1984).

Alíquota (entre 8 a 10 mg) foi solubilizada em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 de carboidrato) e 1 mL de iodeto de metila (CH_3I). A amostra foi mantida sob agitação por 30 a 40 min e em seguida deixada em repouso. Após 24 h, acrescentou-se água destilada à alíquota, que foi neutralizada com ácido acético glacial em banho de gelo, dialisada (membrana de 8 kDa) contra água corrente por 48 h e liofilizada. Todo o procedimento foi repetido para garantir a metilação total dos polissacarídeos.

4.7 Avaliação dos componentes da biomassa obtida no cultivo de *L. theobromae* em diferentes fontes de carbono

A biomassa seca obtida no cultivo de *L. theobromae* em diferentes fontes de carbono foi avaliada quanto ao conteúdo de compostos apolares e carboidratos.

Além disso, também foram determinados quanto à composição monossacarídica (item 4.6.3.1) enquanto à estrutura pelo teste de espectroscopia de RMN (item 4.6.3.3.3).

4.7.1 Extração de compostos apolares com clorofórmio-metanol

A biomassa seca obtida após o processo fermentativo foi congelada (-22°C) e armazenada até o momento da extração.

O extrato de cada amostra foi obtido pela extração em Soxlet usando uma solução de Clorofórmio e Metanol (1:1, v/v).

Após a extração, a biomassa residual foi seca em estufa a 35°C até peso constante. A porcentagem de compostos apolares foi calculada pela razão entre a massa seca da biomassa antes e depois da extração orgânica.

4.7.2 Extração de carboidratos por solução alcalina à quente

O material obtido após extração com clorofórmio-metanol foi tratado com solução de KOH a 10%, sob refluxo em banho com água fervente, na presença de boridreto de sódio (NaBH_4) para evitar degradação das cadeias de polissacarídica.

Os carboidratos solúveis em álcali presente na biomassa deslipidificada foram extraídos com solução de NaOH 10% (p/v) a quente (100°C), sob refluxo, por 2 h. O extrato

obtido foi neutralizado com ácido acético (CH_3COOH) e dialisado (membrana de diálise de 12kDa de poro) contra água corrente por 48 h. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida até pequeno volume e liofilizado para quantificar a massa total de carboidratos presentes em cada amostra.

4.7.3 Purificação das frações de carboidratos presentes na biomassa fúngica de *Lasiodiplodia theobromae* pelo método de congelamento e degelo

O conteúdo de carboidratos totais oriundos do micélio de *L. theobromae* cultivado em diferentes fontes de carbono foi solubilizado em água e submetido ao processo de congelamento (-5°C) e posterior degelo na temperatura ambiente (Gorin e Iacomini, 1984). O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por filtração simples usando filtro de papel. Esse processo de purificação foi repetido em torno de 5 vezes, ou até que a porção precipitada não apresentasse mais carboidratos na porção solúvel por congelamento e degelo.

Foram avaliadas as frações “solúvel” e “insolúvel” de carboidratos da biomassa cultivada em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, sacarose comercial e melão). As frações solúveis receberam prefixo S em seu nome e as frações insolúveis em água fria receberam o prefixo P.

4.8 Produção de EPS em Bioreator de Bancada

Após o DCCR em agitador orbital (item 4.4), o meio otimizado foi testado em bioreator (TEC-BIO, Tecnal, Piracicaba).

4.8.1 Descrição do equipamento

O bioreator usado neste trabalho é um reator encamisado do tipo tanque ideal agitado. O cultivo foi conduzido em modo descontínuo usando pá agitadora helicoidal (Figura 5).

O vaso de reação é feito de inox, com 9 cm de raio e, volume útil de 4600 mL. O equipamento também possui quatro defletores (chicanas, ou “baffles” em inglês) radiais (15 cm de diâmetro, 14 mm de largura e 22 cm de altura) igualmente espaçados. Foi utilizada pá helicoidal (diâmetro= 60 mm, altura=80 mm, largura da hélice= 7mm) situada a 60 mm da base do vaso de reação.

O bioreator é monitorado e comandado pelo programa TECBIO® (Tecnal, Piracicaba, São Paulo), através do qual é possível controlar e monitorar a aeração, a agitação da pá sobre o caldo fermentativo, a temperatura da água do banho termostático (com circulação na

“camisa” do vaso de reação), a pressão interna no interior do vaso e o nível da coluna líquida. Os dados de oxigênio dissolvido (OD), rotação, temperatura, nível e pressão no interior do vaso de reação foram coletados a cada 30 segundos durante todos os cultivos.

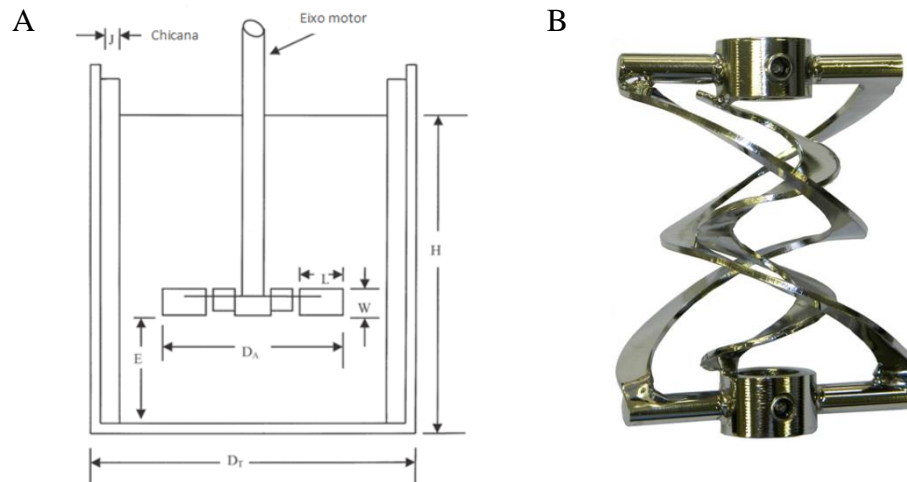


Figura 5:A) Esquema de Bioreator com pá de Rushton, mostrando suas dimensões: J=largura da chicana; H=altura do líquido, W= altura da pá; D_A=diâmetro da pá agitadora, E=altura entre pá agitadora e base do bioreator; L=largura da pá de Rushton, D_T=Diâmetro do vaso de reação. B) Foto da pá helicoidal utilizada nos cultivos com *Lasiodiplodia theobromae*. Fonte A) Adaptado de Doran (2013); B) Foto de Bruno H. de Oliveira.

O ar injetado, após atravessar um filtro com membrana de 0,22 μ m de poro (Millex, Millipore®), perfunde o meio ao passar por um aspersor (“sparger”) em formato circular com perfurações em sua face superior (aspersor tipo “open pipe”), que forma pequenas bolhas que favorecem a distribuição de ar pelo meio de cultivo. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultura foi monitorada através de um eletrodo amperométrico autoclavável (Sensor InPro 6800/12/320, Mettler Toledo, Barueri, SP) posicionado a 5cm da parede do vaso de reação. O eletrodo de O₂ foi calibrado após esterilização do meio de cultivo e antes do inóculo de células fúngicas no reator, com o meio na temperatura de cultivo (28°C). O meio de cultura foi saturado com gás nitrogênio (N₂) ou ar atmosférico para calibração dos pontos 0 e 100% de OD, respectivamente. De acordo com Liu (2013), a saturação de oxigênio na água a 27°C é de 8,07 mg/L. Os dados são apresentados em porcentagem de saturação de oxigênio no meio nas condições de cultivo (meio mínimo de Vogel acrescido de 56,6 g/L de sacarose comercial, mantido a 28°C), uma vez que a solubilidade do O₂ varia, principalmente, em função dos solutos presentes e da temperatura no momento da calibração.

As leituras de velocidade de rotação das pás foram feitas por sensor ótico acoplado ao motor do equipamento.

A temperatura foi controlada automaticamente por um banho termostatzado com circulação externa de água na camisa. A determinação da temperatura foi medida por sensor (PT-100) localizado em poço externo ao vaso de reação. A temperatura foi controlada de maneira a manter o meio de cultivo a $28,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Leituras simultâneas de temperatura nas amostras coletadas foram executadas usando termômetro de mercúrio (Incoterm, Porto Alegre, RS).

A saída de ar do bioreator possui condensador, através do qual circulava água a 4°C em contracorrente para favorecer a precipitação de vapores formados no interior do vaso de reação. O sistema de controle da pressão interna no vaso de reação é composto por sensor Piezo-Resistivo e linha de alívio comandada por válvula, que permite a despressurização quando o interior do vaso atingisse 200 mm Hg (0,26 atm).

O nível da coluna de líquido (nível de espuma) foi monitorado por sensor condutivo.

4.8.2 Condições de cultivo

O cultivo de *L. theobromae* foi conduzido utilizando os sais mínimos de Vogel (1956) e o meio otimizado pelo estudo do DCCR (composto de 56,6 g/L de sacarose comercial e 2,03 g/L de nitrato de amônio), em fermentação submersa, modo batelada simples e sem controle de pH.

Um total de 4490 mL desse meio acrescido de 50 mg/L de cloranfenicol (NeoFenicol®, Neo Química) e 0,15 mL/L de antiespumante emulsionado à base de polímeros de silicone (SQ 4730, Silaex®, São Paulo, SP) foi preparado. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 utilizando solução de HCl 0,5 mol/L.

O vaso de reação e seus acessórios foram esterilizados em autoclave (por 45 min a 121°C). Mangueiras de silicone conectavam o vaso aos sensores, às linhas de coleta de amostras e às linhas de aeração e exaustão de gás. Todas as linhas de ar, seja de entrada ou saída, estavam conectadas a filtros absolutos (membrana de $0,22\mu\text{m}$ de poro, Millex, Millipore®).

Para início do cultivo, uma alíquota de 90 mL da solução de inóculo padronizada (Item 4.1.2) foi transferida assepticamente ao bioreator.

4.8.3 Análise da morfologia do fungo *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em bioreator

Amostras do caldo fermentado obtido no bioreator foram centrifugadas por 60s a 5000g, o caldo sem células foi descartado. Foi acrescentado solução de NaCl (0,09 % m/v), a biomassa precipitada foi ressuspendida e centrifugada nas mesmas condições. Filamentos sem caldo de cultivo foram corados com azul de bromofenol e visualizados em microscópio ótico. Imagens das lâminas das amostras do tempo final de cada cultivo foram capturadas usando máquina fotográfica acoplada ao microscópio. O algoritmo “Find Edges” do programa computacional ImageJ (versão 1.47v, NIH, EUA) foi usado para realçar os limites das células.

4.8.4 Influência da Aeração na biossíntese de EPS pelo fungo filamentoso *L. theobromae*

Os cultivos foram conduzidos com velocidade de agitação da pá constante e igual a 300 rpm, enquanto a aeração foi testada em dois diferentes níveis: 0,8 e 1,5 vvm. O cultivo foi acompanhado até que todo substrato fosse consumido ou até que a concentração de OD fosse igual ou inferior a 20% de saturação.

Para as avaliações ao longo do cultivo, foram coletados entre 10 e 70 mL de caldo fermentativo, de acordo com o tempo de coleta e as avaliações a serem executadas. A retirada do material foi realizada através de um coletor em forma de cano, com 4 mm de diâmetro e 21,5 cm de comprimento, dispensado-se os 5 mL iniciais antes do armazenamento da amostra a ser analisada. As coletas eram feitas nos tempos 0, 2, 6, 8, 12, 16, 18, 24, 30, 36, 40 e 48 h. Assim que a amostra era coletada, a temperatura do caldo fermentativo era checada com termômetro de mercúrio (Incoterm, Porto Alegre, RS) e o pH avaliado por potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

As amostras coletadas no intervalo de 0 a 12h foram avaliadas para pH, concentração de biomassa seca e açúcares redutores totais. As amostras das demais coletas foram avaliadas, também, quanto ao conteúdo de EPS produzido e propriedades reológicas de caldo fermentado com células e sem células.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada aeração e os resultados mostram a média das respostas em cada condição estudada.

4.8.5 Cálculo de Coeficientes do processo fermentativo

Em bioreator, além dos parâmetros de rendimento (item 4.1.7), outros parâmetros cinéticos foram calculados. Dentre elas a produtividade, e as velocidades instantânea e específica de síntese de biomassa, de produto e de consumo de substrato.

A produtividade foi calculada pela razão da concentração obtida do componente pelo tempo de cultivo no momento da coleta (Equações 4 e 5). A velocidade instantânea foi calculada pela linearização da curva dos componentes em função do tempo. Abaixo são apresentadas as equações de velocidade instantânea de síntese de biomassa (r_x), velocidade instantânea de síntese de produto (r_p) e velocidade instantânea de consumo de substrato (r_s) (Equações 6 a 8). No cultivo em bioreator foram também calculadas as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) e de síntese de produto (μ_p) e células (μ_x) (Equações 9 a 11).

$$P_x(\text{g/Lh}) = \frac{\text{Biomassa Seca (g/L)}}{\text{tempo de coleta (h)}} \quad \text{Equação 4}$$

$$P_p(\text{g/Lh}) = \frac{\text{EPS seco (g/L)}}{\text{tempo de coleta (h)}} \quad \text{Equação 5}$$

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 6}$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad \text{Equação 7}$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad \text{Equação 8}$$

$$\mu_x = \frac{1}{X^*} \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 9}$$

$$\mu_p = \frac{1}{P^*} \frac{dP}{dt} \quad \text{Equação 10}$$

$$\mu_s = -\frac{1}{S^*} \frac{dS}{dt} \quad \text{Equação 11}$$

sendo X^* , P^* e S^* as concentrações iniciais de biomassa, produto e substrato, respectivamente. Entende-se por inicial, no caso de produto, a primeira amostra no qual foi detectada a presença de EPS nos cultivos em bioreator.

4.8.6 Determinação das razão entre as glucanas SEPS e PEPS no cultivo em bioreator em diferentes aerações

No final do cultivo em bioreator (em 72h para o cultivo a 0,8 vvm e em 48h para o cultivo a 1,5 vvm) 500 mL de caldo fermentativo foram centrifugados (30 min, 3500g e 4°C) para determinação da concentração das glucanas de diferentes pesos moleculares produzidas por *L. theobromae*.

A razão entre as massa de cada uma dessas glucanas (Razão SEPS:PEPS, em g/g) presentes em um litro de meio de cultivo no momento da coleta foi calculada de acordo com a Equação 12, para cada aeração testada.

$$\text{Razão SEPS:PEPS} = \frac{\text{Massa de SEPS (g)}}{\text{Massa de PEPS (g)}} \quad \text{Equação 12}$$

4.8.7 Determinação do Consumo de O₂ em Bioreator de Bancada

O consumo de oxigênio foi medido após corte no fornecimento de oxigênio injetado através do aspersor e manutenção da agitação para homogeneizar o caldo fermentativo. A queda na concentração instantânea de O₂ dissolvido (OD) foi monitorada durante o período sem aeração pelo software TECBIO ®. Para cada tomada de leitura, foram plotadas as concentrações de OD em função do tempo entre os momentos de corte e de retomada da aeração. A tangente do ângulo formado entre essa reta e o eixo do tempo (eixo das abcissas) representa a velocidade de consumo de O₂, em %/min. A velocidade de consumo de OD obtida foi, posteriormente, dividida pela concentração celular no momento do teste de consumo. Esse parâmetro - q_{Ox} , velocidade específica de respiração - é uma medida indireta do metabolismo fúngico, medindo a demanda de O₂ por grama de biomassa no instante da tomada de dados. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 13.

$$Q_{Ox} = \frac{1}{X} \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad \text{Equação 13}$$

O consumo de O₂ foi medido após 24 h de fermentação, em todas replicatas, nas duas aerações testadas.

4.8.8 Método dinâmico para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) em bioreator de bancada no cultivo de *Lasiodiplodia theobromae*

Com 24h de cultivo, na presença de micro-organismo, após ser executada a determinação de consumo de O₂, foram coletados dados de oxigênio em função do tempo para determinação do k_{LA} em cada uma das aerações (0,8 e 1,5 vvm), de acordo com o Método Dinâmico. Nos momentos da coleta de amostra, a aeração foi interrompida por um período entre 5 e 8 min, mantendo a agitação para homogeneizar o caldo, quando foram coletados dados para consumo de OD. Após a retomada da aeração, a concentração de OD aumenta até um valor de equilíbrio (\bar{C}_{LA}). Entre a retomada da aeração e o equilíbrio foi calculadas a taxa de aumento da porcentagem de saturação de OD entre dois tempos distintos (t1 e t2) e suas respectivas concentrações de oxigênio (C_{LA1} e C_{LA2}). Essas informações foram plotadas em função da diferença dos tempos. O k_{LA} foi calculado em função desses dados, como mostra a Equação 14 a seguir.

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C}_{LA} - C_{LA1}}{\bar{C}_{LA} - C_{LA2}}\right)}{t_1 - t_2} \quad \text{Equação 14}$$

O $k_L a$ é dependente da concentração de oxigênio nos tempos t_1 (C_{LA1}) e t_2 (C_{LA2}), da concentração de oxigênio no equilíbrio, e também da diferença entre esses tempos.

Um gráfico de $\ln\left(\frac{\bar{C}_{LA} - C_{LA1}}{\bar{C}_{LA} - C_{LA2}}\right)$ é plotado em função da diferença entre os tempos t_1 e t_2 (Figura 6). O $k_L a$ será a tangente do ângulo formado entre a curva formada pelos dados e o eixo das abscissas.

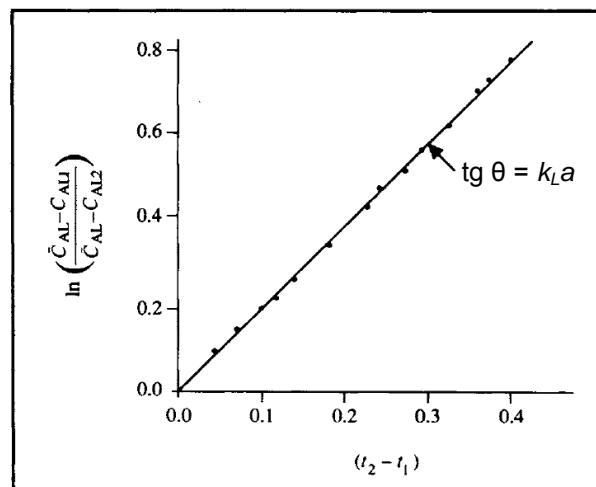


Figura 6: Avaliação do $k_L a$ usando o Método Dinâmico. Adaptado de Doran (2013).

4.8.9 Comportamento Reológico – Regime Estacionário

O estudo reológico em viscosímetro do caldo fermentado foi realizado nas amostras obtidas do cultivo de *L. theobromae* em bioreator. Amostras foram coletadas nos tempos 18, 24, 30, 36, 48, 54, 60 e 72 h de fermentação. Para cada amostra foi avaliadas a influência da taxa de cisalhamento na viscosidade (curva de viscosidade) e na tensão de cisalhamento (curva de fluxo). Foram coletados dados de tensão de cisalhamento (τ , em pascal, Pa) e viscosidade aparente (η , em centipoise, cP) para cada taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, em segundo recíproco, s^{-1}) aplicada nas amostras. São dados válidos aqueles compreendidos entre 10 e 100% de tensão inerente do sensor, de acordo com instruções do fabricante. O sensor utilizado era sensível às leituras com viscosidade de, pelo menos 2 cP (a $150 s^{-1}$). Algumas amostras, portanto, foram lidas após um mínimo de 18 ou 36h de fermentação, para que a síntese de EPS e o crescimento celular conferissem as características viscosas ao fluido. Dados fora da faixa mencionada não foram usados.

Os testes foram executadas em triplicata e, para cada avaliação, foram usadas amostras diferentes, para evitar efeito do tempo e do cisalhamento nas características físicas desse

fluido. Os testes foram realizados em viscosímetro de cilindros coaxiais (Brookfield LV DV II+ Programable), acoplado com adaptador de pequenas amostras, que executa suas avaliações em modo CR (“controlled shear rate” ou velocidade controlada, no qual a taxa de cisalhamento é aplicada e a tensão de cisalhamento é medida). Foi utilizado o sensor número 18 (que coleta dados entre as taxas de cisalhamento $0,396 \text{ s}^{-1}$ e 264 s^{-1}) e número 31 (capaz de coletar dados entre as taxas de cisalhamento $0,1$ e 68 s^{-1}). Diferentes velocidades de rotação do cilindro, correspondente às diferentes taxas de cisalhamento, foram aplicadas sobre os fluidos. A rotação do sensor percorreu velocidades crescentes, entre $0,3$ e 200 rpm. A aquisição e o armazenamento dos dados foram intermediados pelo programa Wingather (versão 2.1, Brookfield). Para cada taxa de cisalhamento foram aguardadas 5 rotações para que o motor superasse a inércia do sensor mergulhado no fluido a ser analisado.

Foram analisadas as curvas de fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) e de viscosidade (taxa de cisalhamento x viscosidade) para cada amostra analisada. Na descrição do comportamento reológico foram utilizados dois modelos empíricos para relacionar os dados de tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento. Os modelos reológicos de Ostwald-de-Waele (Equação 15) e Herschel-Bulkley (Equação 16) foram ajustados com auxílio do programa OriginPro (versão 6.0, OriginLab Corporation) aos dados coletados. Os modelos reológicos estudados diferenciam-se pela presença/ausência de tensão inicial (τ_0), que pode ser definida como a mínima tensão de cisalhamento necessária para o que o fluido inicie o escoamento.

$$\tau = K_{OW}(\dot{\gamma})^{n_{OW}} \quad \text{Equação 15}$$

$$\tau = \tau_0 + K_{HB}(\dot{\gamma})^{n_{HB}} \quad \text{Equação 16}$$

onde τ é a tensão de cisalhamento; $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento; K_{OW} e K_{HB} são os índices de consistência dos modelos de Ostwald-de-Waele e de Herschel Bulkley, respectivamente; τ_0 é a tensão inicial do modelo de Herschel Bulkley e n_{OW} e n_{HB} são os índices de comportamento reológico dos modelos de Ostwald-de-Waele e de Herschel Bulkley, respectivamente. O ajuste dos dados aos modelos matemáticos propostos foi mensurado pelos valores de Qui-Quadrado (χ^2), Soma dos Quadrados dos Resíduos (SQR) e pelo Coeficiente de Determinação (R^2). O modelo com melhor ajuste é aquele com altos valores de R^2 e baixos valores de χ^2 e SQR.

A pseudoplasticidade dos fluidos foi comparada ao longo do tempo de cultivo em cada aeração testada. Para isso, os valores dos índices de comportamento (n_{OW} e n_{HB}) e de consistência (K_{OW} , K_{HB}) foram apresentados nas duas condições de aeração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo da produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* em frascos Agitados

5.1.1 Efeito de diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio na produção de EPS

Visando encontrar os nutrientes que favorecessem a produção de EPS, o fungo *L. theobromae* foi cultivado em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, lactose, sacarose pura, sacarose comercial e melação de cana de açúcar) e nitrogênio (nitrato de amônio, fosfato de amônio, nitrato de amônio e uréia). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e síntese de EPS cultivando *Lasiodiplodia theobromae*.

Tratamento	Biomassa (g/L)	EPS (g/L)	ART Consumido (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/P}$ (g/g)
Fontes de Carbono						
Sacarose PA	24,3±0,9	2,5±1,0	46,5 ± 0,5	0,52	0,05	9,7
Sacarose Comercial	23,4±1,0	2,5±1,3	46,0 ± 0,9	0,51	0,06	9,4
Glicose	16,7±1,5	1,7±0,4	46,7 ± 1,2	0,36	0,04	9,8
Frutose	13,3±1,6	2,1±1,3	37,8±2,2	0,37	0,05	6,3
Lactose	1,4±0,4	0,0	2,1±1,6	0,53	0,00	-
Melaço	44,6±3,0	2,8±0,6	25,2±2,3	1,49	0,11	15,9
Fontes de Nitrogênio						
Nitrato Sódio	11,8±1,8	1,2±0,3	23,3±7,7	0,50	0,05	9,8
Fosfato Amônio	11,5±2,2	1,2±0,2	35,6±3,7	0,32	0,03	9,6
Nitrato Amônio	16,9±1,6	2,0±0,3	46,7±2,5	0,36	0,04	8,4
Uréia	14,4±1,5	1,8±0,2	45,8±0,9	0,31	0,04	8,0

EPS= exopolissacarídeo; ART= açúcares redutores totais; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ = conversão de substrato em produto; $Y_{X/P}$ = razão biomassa/produto.

Foram obtidos aproximadamente de 2,3 g/L de EPS usando sacarose P.A., sacarose comercial, glicose, frutose ou melaço. O resultado mostra a versatilidade do fungo em utilizar diferentes substratos para produzir EPS.

É interessante observar que, nos cultivos com frutose, o crescimento celular foi em média 45% menor do que nos cultivos com sacarose pura ou comercial, e ainda assim a concentração de EPS foi similar a esses tratamentos. A menor razão $Y_{X/P}$ nos cultivos com frutose (6,3 g/g) em relação aos cultivos com sacarose (9,7 g/g) é um dado interessante, pois a biomassa pode afetar as propriedades físicas do meio de fermentação, aumentando a

viscosidade e dificultando a aeração e o processo de purificação. Assim, o menor crescimento celular associado a uma maior produção de EPS é desejável e pode ser verificado nos cultivos com frutose.

Apesar de ter sido verificado neste trabalho que o EPS de *L. theobromae* seja uma glucana, os cultivos com glicose proporcionaram produção de EPS similar (1,7 g/L) ao meio contendo frutose (2,1 g/L) ou sacarose (2,5 g/L). Melaço também produziu quantidades estatisticamente próximas às outras fontes. Entretanto, a utilização de melaço proporcionou crescimento celular em média 80% maior do que o verificado com estas mesmas fontes. Assim, ao contrário dos ensaios com frutose, a relação $Y_{X/P}$ nos ensaios com melaço foi a maior deste experimento (15,9 g/g).

O melaço de cana de açúcar representa uma fonte nutricional de composição complexa (TECLU et al., 2009), o que pode explicar o grande crescimento de biomassa e de produção de EPS. Considerando que o melaço é um subproduto de outros processos, usar este composto como fonte de carbono visando obter um produto de alto valor, como o EPS de *L. theobromae*, é promissor, uma vez que pode significar redução de custos no processo de produção. Um fator a ser considerado nos cultivos realizados com melaço é a característica do EPS produzido. A pigmentação do melaço e o conteúdo protéico é transferida para o EPS que se torna marrom escuro, diferente do material branco obtido com outras fontes. Ainda que a relação custo-benefício do melaço justifique sua utilização, os custos com os processos de separação e purificação do EPS para remover contaminantes deve ser considerada para justificar sua utilização na produção comercial deste polissacarídeo.

Como observado no presente estudo, Steluti e colaboradores (2004) obtiveram maior produção de biomassa e EPS no cultivo de *B. rhodina* utilizando melaço. No entanto, no estudo de *B. rhodina*, melaço, sacarose pura e comercial mostraram resultados semelhantes. Por outro lado, estudos de Cunha e colaboradores (2012) com *L. theobromae* resultaram em maior produção de EPS com glicose (2 g/L) do que a sacarose (1,36 g/L).

Nos cultivos com lactose não foi verificada produção de EPS e apenas pequeno crescimento celular, indicando que *L. theobromae* não é capaz de metabolizar esse dissacarídeo.

Para estudar a influência da fonte de nitrogênio na produção de EPS por *L. theobromae*, os cultivos foram realizados usando sacarose comercial (50 g/L) e MMSV (Tabela 2), tendo em vista que sacarose é uma fonte de carbono economicamente acessível para aplicações industriais no Brasil.

Os ensaios com diferentes fontes de nitrogênio indicaram novamente a versatilidade nutricional do fungo, sendo verificado crescimento celular e produção de EPS nas 4 fontes avaliadas. As maiores concentrações de EPS (2,0 g/L) e biomassa (16,9 g/L) foram obtidas usando NH_4NO_3 , que faz parte da composição original do meio mínimo de Vogel. Os valores de rendimento, entretanto, não apresentaram grande variação entre as fontes de nitrogênio avaliadas.

Até o presente momento, o único estudo com diferentes fontes de nitrogênio com *L. theobromae* foi o trabalho realizado por Cunha e colaboradores (2012), que priorizaram fontes orgânicas (peptona e extrato de levedura). O efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de EPS a partir de *B. rhodina* (DABAC-P82) foi estudado por Selbmann, Stinglele e Petruccioli (2003). Os testes foram realizados com 30 g/L de glicose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio (3 g/L), tal como uréia, NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A concentração mais elevada de EPS foi de 16 g/L em cultura de 24 h, utilizando NaNO_3 como fonte de nitrogênio. Fariña e colaboradores (1998), usando o *Sclerotium rolfsii* descobriram que a produção de escleroglucana foi aumentada usando nitrato (25,2 g/L), enquanto NH_4^+ inibia a biossíntese de EPS.

5.1.2 Estudo da influência da concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) na produção de EPS por *L. theobromae*

A influência da concentração de sacarose comercial (X1) e nitrato de amônio (X2) foi avaliada por dois delineamentos experimentais 2^2 independentes com 12 experimentos contendo quatro repetições do ponto central e quatro pontos axiais.

Um DCCR teve tempo de fermentação de 72 h e o outro DCCR, com a mesma formulação, foi cultivado até 96 h.

A Tabela 3 apresenta a matriz de planejamento com as variáveis codificadas e as respostas obtidas em cada meio formulado, após 72 h de cultivo.

Nesse estudo a maior concentração de EPS (2,2 g/L) foi obtida no meio número 6, que continha a maior concentração de carbono e a concentração intermediária de nitrogênio. Esse dado indica que o acréscimo da concentração de carbono favorece a síntese de EPS por *L. theobromae*, enquanto o aumento na concentração de nitrato de amônio apresentou efeito antagônico na síntese de EPS. Um grande crescimento celular foi observado no meio número 7 (13,2 g/L), composto da concentração intermediária de carbono e menor concentração de nitrogênio. Esse resultado indica que o aumento da concentração de nitrogênio no meio de

cultivo apresenta efeito oposto na concentração de biomassa, enquanto que a sacarose favorece crescimento celular. Um maior fator de conversão $Y_{X/S}$ foi obtido no meio número 1, que contém baixos níveis de carbono e nitrogênio. Em 72h de cultivo 34% do substrato consumido era convertido em biomassa. A conversão de substrato em biomassa também foi influenciada pelas variáveis testadas, sendo a maior conversão de 0,33 a maior observada, nos ensaios 1 e 7. Essas formulações continham os mais baixos níveis de nitrato (2 e 2,3 g/L de nitrato de amônio no início do cultivo).

Tabela 3: Matriz do DCCR2² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por *L. theobromae* MMBJ por 72h.

Ensaio	X1	X2	*Biomassa (g/L)	*EPS (g/L)	ART Consumido		* $Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/P}$
					(g/L)	%			
1	-1	-1	12,1	1,9	35,2	82	0,34	0,05	6,5
2	-1	1	8,7	1,6	32,6	76	0,27	0,05	5,3
3	1	-1	12,8	2,1	43,7	77	0,29	0,05	6,0
4	1	1	9,2	1,8	36,2	63	0,25	0,05	5,2
5	- α	0	7,1	1,5	27,4	69	0,26	0,05	4,3
6	+ α	0	9,5	2,2	35,9	60	0,27	0,06	4,4
7	0	- α	13,2	2,1	40,3	81	0,33	0,05	6,2
8	0	+ α	6,2	1,7	30,2	60	0,20	0,06	3,6
central	0	0	9,0 \pm 3,2	1,7 \pm 0,1	32,9 \pm 10,6	66 \pm 21	0,27 \pm 0,0	0,06 \pm 0,03	5,4 \pm 1,9

X1=sacarose comercial, X2=nitrato de amônio, $\alpha=1,41$. *resposta influenciada pelas variáveis.

A estimativa dos efeitos para esse planejamento é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Estimativa de efeito para concentração de EPS, biomassa e fator de conversão $Y_{X/S}$ em 72 h de cultivo por *L. theobromae* em diferentes formulações de meio.

Resposta	Variável	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Coefficiente Regressão
Biomassa $R^2=0,45$	Intercepto	9,56	0,61	0,000	9,56
	X2 (L)	-4,23	1,49	0,017	-2,12
EPS $R^2=0,86$	Intercepto	1,67	0,05	0,000	1,67
	X1 (L)	0,34	0,08	0,003	0,16
	X1 (Q)	0,15	0,09	0,132	0,07
	X2 (L)	-0,29	0,08	0,007	-0,14
$Y_{X/S}$ $R^2=0,58$	X2 (Q)	0,25	0,09	0,022	0,45
	Intercepto	0,28	0,01	0,000	0,28
	X2 (L)	-0,07	0,02	0,004	-0,04

EPS = exopolissacarídeo; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; X1= sacarose comercial, X2=nitrato de amônio; p-valor = nível descritivo do teste estatístico; (L)=índice linear, (Q)=índice quadrático.

A análise das variáveis significativas para o fator de conversão $Y_{X/S}$ mostraram que apenas o nitrogênio causa efeito negativo de -0,07 na conversão de substrato em biomassa, ou seja, a conversão de substrato para células é maior quanto menores forem os níveis de nitrogênio (Tabela 4). Os dados mostram os coeficientes significativos para os modelos matemáticos de predição da resposta, os valores de F_{calc} , quadrados médios (MQ) e soma dos quadrados dos resíduos (SQ). Em 72h, pode ser observado que a concentração de EPS sofre efeitos antagônicos das variáveis carbono e nitrogênio. O aumento da concentração de sacarose do nível (-) para o nível (+) proporciona o aumento de 0,34 g/L de EPS, no entanto, o aumento da concentração de nitrato de amônio causa redução de 0,29 g/L de EPS.

Para as respostas coletadas em 72h, apenas a concentração de biomassa, de EPS e o fator de conversão $Y_{X/S}$ foram influenciadas pelas diferentes concentrações de sacarose e nitrato de amônio (Tabela 5).

Tabela 5: ANOVA obtida para o DCCR 2² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de *L. theobromae* até 72h.

Resposta	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F_{calc}	p -valor
Biomassa $R^2=0,45$	X2 (L)	35,83	1	35,83	8,07	0,02
	Resíduo	44,41	10	4,44	-	-
	Total	80,24	11	-	-	-
EPS $R^2=0,86$	X1 (L)	0,226	1	0,23	19,37	0,003
	X1 (Q)	0,034	1	0,03	2,91	0,13
	X2 (L)	0,171	1	0,17	14,66	0,006
	X2 (Q)	0,101	1	0,10	8,70	0,021
	Resíduo	0,082	7	0,01	-	-
	Total	0,595	11	-	-	-
$Y_{X/S}$ $R^2=0,58$	X2 (L)	0,011	1	0,011	13,72	0,004
	Resíduo	0,008	10	0,0007	-	-
	Total	0,018	11	-	-	-

EPS = exopolissacarídeo; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; X1= sacarose comercial, X2=nitrato de amônio; p -valor = nível descritivo do teste estatístico; SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ: quadrado médio; F_{calc} =valor de F calculado para o teste; (L)=índice linear, (Q)=índice quadrático.

A concentração de nitrogênio foi a única variável significativa nessa resposta (p -valor<0,05), sendo que o aumento da concentração desse nutriente de (-) para (+) causou efeito negativo de -4,2 g/L na concentração de biomassa.

A Figura 7 mostra a superfície de resposta para a concentração de biomassa (A), de EPS (B) e para a conversão de substrato em biomassa (C).

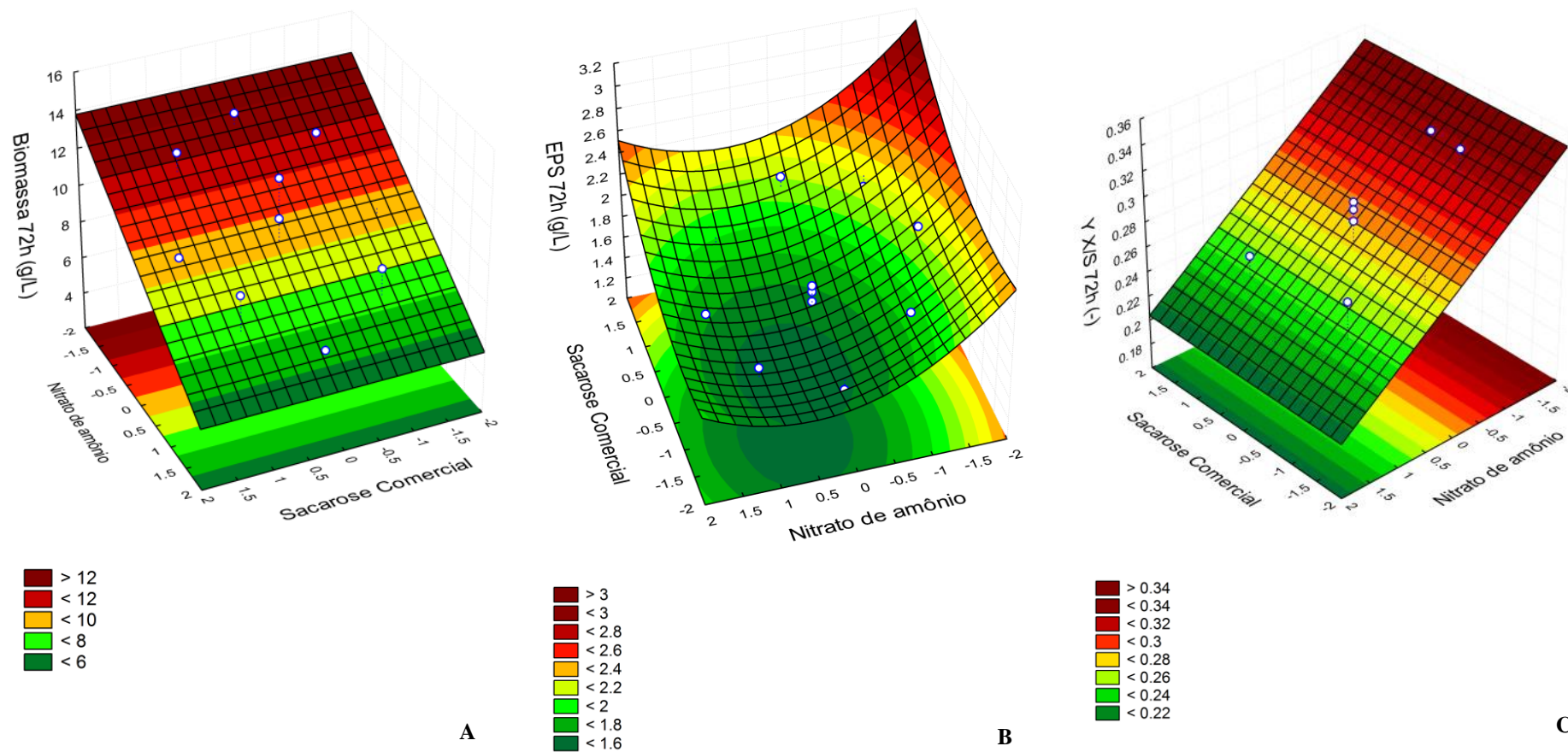


Figura 7: Superfície de Resposta para biomassa (A), EPS (B) e $Y_{X/S}$ (C) na fermentação de *L. theobromae* em meio contendo diferentes concentrações de sacarose comercial e nitrato de amônio, após 72h de cultivo.

Assim, as equações 17 a 19, contendo os fatores significativos para o modelo, que descrevem as respostas observadas em função da concentração de carbono e nitrogênio em valores codificados são:

$$[Biomassa] \text{ g/L} = 9,56 - 2,11 \cdot X_2 \quad \text{Equação 17}$$

$$[EPS] \text{ g/L} = 1,67 + 0,17 \cdot X_1 + 0,07 \cdot (X_1)^2 - 0,15 \cdot X_2 + 0,12 \cdot (X_2)^2 \quad \text{Equação 18}$$

$$Y_{X/S} \text{ g/g} = 0,28 - 0,04 \cdot X_2 \quad \text{Equação 19}$$

As respostas do DCCR interrompido em 96h estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz do DCCR² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por *L. theobromae* MMBJ por 96h.

Ensaio	X ₁	X ₂	*Biomassa (g/L)	*EPS (g/L)	*ART		*Y _{X/S}	*Y _{P/S}	*Y _{X/P}
					Consumido (g/L)	%			
1	-1	-1	17,5	1,60	42,0	98	0,42	0,04	11,1
2	-1	1	15,2	1,41	41,9	98	0,37	0,03	10,8
3	1	-1	18,0	1,71	51,9	91	0,35	0,03	10,5
4	1	1	18,4	1,51	52,5	92	0,35	0,03	12,2
5	-α	0	15,6	1,44	39,3	98	0,40	0,04	10,8
6	+α	0	19,0	1,43	56,0	93	0,34	0,03	13,2
7	0	-α	18,2	1,90	48,1	96	0,38	0,04	9,6
8	0	+α	17,1	1,58	48,5	97	0,35	0,03	10,9
central	0	0	15,9 ±1,2	1,90 ±0,1	48,0 ±1,2	96 ±2	0,33 ±0,02	0,04 ±0,00	8,5 ±0,5

X₁=sacarose comercial, X₂=nitrato de amônio, α=1,41. *resposta influenciada pelas variáveis.

Nesse ensaio, a maior concentração de biomassa foi obtida no ensaio 7, cujo meio era composto da máxima quantidade de sacarose e quantidade intermediária de nitrogênio. O aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo do ponto (-) para o ponto (+) causa aumento na concentração de biomassa, enquanto que o aumento da concentração de nitrato tem efeito oposto. A concentração de EPS foi influenciada da mesma maneira pelos nutrientes do meio. O aumento da concentração de sacarose favorece síntese de EPS em 96h, enquanto que o crescente aumento de nitrato de amônio no meio de cultivo diminui a concentração de EPS produzido em 96h. Na porcentagem de substrato consumido em 96h, o aumento da concentração de nitrogênio apresentou pequeno efeito antagônico no consumo de ART, enquanto que o aumento na concentração inicial de substrato diminui a porcentagem de ART consumidos em 96h.

Para o fator de rendimento $Y_{X/S}$ em 96h, o aumento da concentração de carbono ou nitrogênio no meio de cultivo de (-) para (+) tem efeito oposto na conversão de substrato em biomassa. Ou seja, à medida que a quantidade de nutrientes é aumentada no meio, a conversão de carbono em biomassa é menor no intervalo testado.

O fator de conversão $Y_{P/S}$ em 96h apresenta efeitos sensíveis com o aumento dos nutrientes de (-) para (+) e o rendimento de EPS apresenta em torno de 4%, apesar dos cálculos matemáticos indicarem diferença em função da concentração de nutrientes.

Na Tabela de efeitos do DCCR interrompido em 96h (Tabela 7), percebe-se que todas as respostas foram influenciadas pela concentração dos nutrientes sacarose comercial e nitrato de amônio no intervalo testado.

Tabela 7: Estimativa de efeito para concentração de EPS, biomassa, consumo de ART e fatores de conversão $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, e $Y_{X/P}$ em 96 h de cultivo por *L. theobromae* em diferentes formulações de meio.

Resposta	Variável	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Coefficiente Regressão
Biomassa $R^2=0,73$	Intercepto	16,39	0,41	0,0000	16,39
	X1 (L)	2,13	0,75	0,02	1,06
	X2 (L)	-0,83	0,75	0,30	-0,41
	X2 (Q)	1,43	0,82	0,12	0,72
EPS $R^2=0,81$	Intercepto	1,80	0,04	0,000	1,80
	X1 (L)	0,05	0,07	0,491	0,03
	X1 (Q)	-0,41	0,08	0,001	-0,21
	X2 (L)	-0,21	0,07	0,021	-0,11
ART consumido $R^2=0,96$	Intercepto	47,75	0,27	0,000	47,75
	X1 (L)	11,05	0,67	0,000	5,53
$Y_{X/S}$ $R^2=0,81$	Intercepto	0,33	0,01	0,000	0,33
	X1 (L)	-0,04	0,01	0,010	-0,028
	X1 (Q)	0,04	0,01	0,019	0,02
	X2 (L)	-0,02	0,01	0,118	-0,01
	X2 (Q)	0,04	0,01	0,022	0,02
$Y_{P/S}$ $R^2=0,89$	Intercepto	0,04	0,001	0,000	0,04
	X1 (L)	-0,01	0,001	0,001	-0,003
	X1 (Q)	-0,01	0,001	0,001	-0,004
	X2 (L)	-0,01	0,001	0,006	-0,002
$Y_{X/P}$ $R^2=0,91$	Intercepto	8,55	0,303	0,000	8,55
	X1 (L)	1,09	0,429	0,039	0,55
	X1 (Q)	3,48	0,480	0,001	1,74
	X2 (L)	0,83	0,429	0,095	0,42
	X2 (Q)	1,69	0,480	0,010	0,85

EPS= exopolissacarídeo; ART= açúcar redutor total; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ = conversão de substrato em produto; $Y_{X/P}$ = relação biomassa/produto; X1= sacarose comercial, X2= nitrato de amônio; p-valor= nível descritivo do teste estatístico; (L)= índice linear, (Q)= índice quadrático.

A concentração de carbono e nitrogênio apresentaram efeito contraditório na concentração de biomassa (de +2,13 e -0,83, respectivamente) quando a concentração desses nutrientes aumentava do nível mais baixo para o mais alto (Tabela 7). Esse mesmo efeito contraditório (+0,05 e -0,21, respectivamente) foi verificado para a concentração de EPS obtido em 96h de cultivo.

De maneira diferente, os fatores de conversão $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ são negativamente influenciados pelo aumento da concentração de nutrientes de -0,06 e 0,02 no uso de substrato para síntese de biomassa e EPS (Tabela 7). O aumento da concentração de nutrientes favorece a razão $Y_{X/P}$, que relaciona a massa de biomassa necessária para síntese de 1 g de EPS para cada litro de meio de cultivo. O aumento nos nutrientes, portanto, favorece mais a concentração de biomassa que de EPS em 96h de cultivo.

A Tabela 8 mostra os dados de ANOVA do DCCR cultivado até 96h. Análise de variância indicou que a interação entre as variáveis X1 e X2 não influenciou a concentração de produto formado em 96h. No entanto, quando considerados separadamente, as variáveis X1 e X2 produziram resultados estatisticamente significativos. Sacarose comercial e nitrato de amônio apresentaram uma discreta influência negativa na concentração de produto em 96h de cultivo, levando a uma queda de 0,41 e 0,21 g/L de EPS, respectivamente, quando os níveis dos nutrientes passam do nível -1 para o +1.

A concentração de ART consumido após 96h de cultivo também foi influenciada pelas variáveis testadas. No entanto, somente a variável X1 teve impacto nessa resposta. Essa resposta teve alta correlação ($R^2=0,96$) com a concentração de sacarose comercial no meio, e não foi influenciada pela concentração de nitrato de amônio.

Os efeitos da interação de X1 e X2 não foi estatisticamente significativo, em um limite de confiança de $p < 0,05$, na concentração de biomassa, na conversão de açúcar em biomassa e na relação $Y_{X/P}$. Para a concentração de EPS e o rendimento $Y_{P/S}$ a variável X2(Q) também não foi significativa. A concentração de ART consumido foi influenciada, no intervalo testado, apenas pela concentração inicial de substrato.

A produção de EPS está relacionada ao crescimento celular, como mostra o rendimento $Y_{X/P}$, que foi influenciado pelas concentrações de carbono e nitrogênio ($p \leq 0,10$) e mostrou seu mínimo no ponto central e no ensaio 7 (contendo ambos 50 g/L de sacarose e 3 ou 2 g/L de nitrato de amônio). Nos meios citados, o rendimento $Y_{X/P}$ medido e predito pelo modelo matemático foram coincidentes. Uma baixa relação $Y_{X/P}$ é interessante pois, nela, temos uma maior obtenção de EPS por grama de micélio.

Tabela 8: ANOVA obtida para o DCCR 2² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de *L. theobromae* até 96h.

Resposta	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-valor
Biomassa R ² =0,73	X1 (L)	9,06	1	9,06	10,29	0,02
	X1 (Q)	2,80	1	2,80	3,18	0,12
	X2 (L)	1,37	1	1,37	1,56	0,25
	X2 (Q)	4,62	1	4,62	5,25	0,06
	Resíduo	6,16	7	0,88	-	-
	Total	22,89	11	-	-	-
EPS R ² =0,81	X1 (L)	0,006	1	0,005	0,52	0,49
	X1 (Q)	0,279	1	0,28	25,84	0,001
	X2 (L)	0,088	1	0,09	8,13	0,02
	Resíduo	0,086	8	0,01	-	-
	Total	0,459	11	-	-	-
ART consumido R ² =0,96	X1 (L)	244,26	1	244,26	283,04	0,000
	Resíduo	8,63	10	0,86	-	-
	Total	252,89	11	-	-	-
Y _{X/S} R ² =0,81	X1 (L)	0,003	1	0,003	12,25	0,01
	X1 (Q)	0,003	1	0,003	9,31	0,02
	X2 (L)	0,0009	1	0,001	3,17	0,12
	X2 (Q)	0,002	1	0,002	8,56	0,02
	Resíduo	0,002	7	0,0003	-	-
	Total	0,010	11	-	-	-
Y _{P/S} R ² =0,89	X1 (L)	0,0001	1	0,00008	26,00	0,001
				0,00008	26,16	0,001
	X1 (Q)	0,0001	1	0,00004	13,36	0,007
	X2 (L)	0,00004	1	0,000003	-	-
	Resíduo	0,00003	8	0,00008	-	-
Total	0,0002	11	-	-	-	
Y _{X/P} R ² =0,91	X1 (L)	2,37	1	2,37	6,43	0,04
				19,42	52,73	0,0002
	X1 (Q)	19,42	1	1,38	3,73	0,10
	X2 (L)	1,38	1	4,58	12,42	0,01
	X2 (Q)	4,58	1	0,37	-	-
	Resíduo	2,58	7	-	-	-
Total	27,39	11	-	-	-	

EPS= exopolissacarídeo; ART= açúcar redutor total; Y_{X/S}= conversão de substrato em biomassa; Y_{P/S}=conversão de substrato em produto; Y_{X/P}= relação biomassa/produto; X1= sacarose comercial, X2=nitrato de amônio;p-valor= nível descritivo do teste estatístico; SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ: quadrado médio; F_{calc}=valor de F calculado para o teste; (L)=índice linear, (Q)=índice quadrático.

A superfície de resposta do modelo preditivo para biomassa é mostrado na Figura 7(A), a partir do qual se pode perceber que o crescimento celular não foi favorecido pela fonte de nitrogênio, mas foi positivamente afetado pelo aumento da concentração de sacarose comercial, também necessária para síntese de EPS. As demais Figuras mostram a superfície de resposta gerada para explicar a concentração de EPS (B), ART consumido (C), Y_{X/S} (D), Y_{P/S} (E) e Y_{X/P} (F), obtidos em 96h.

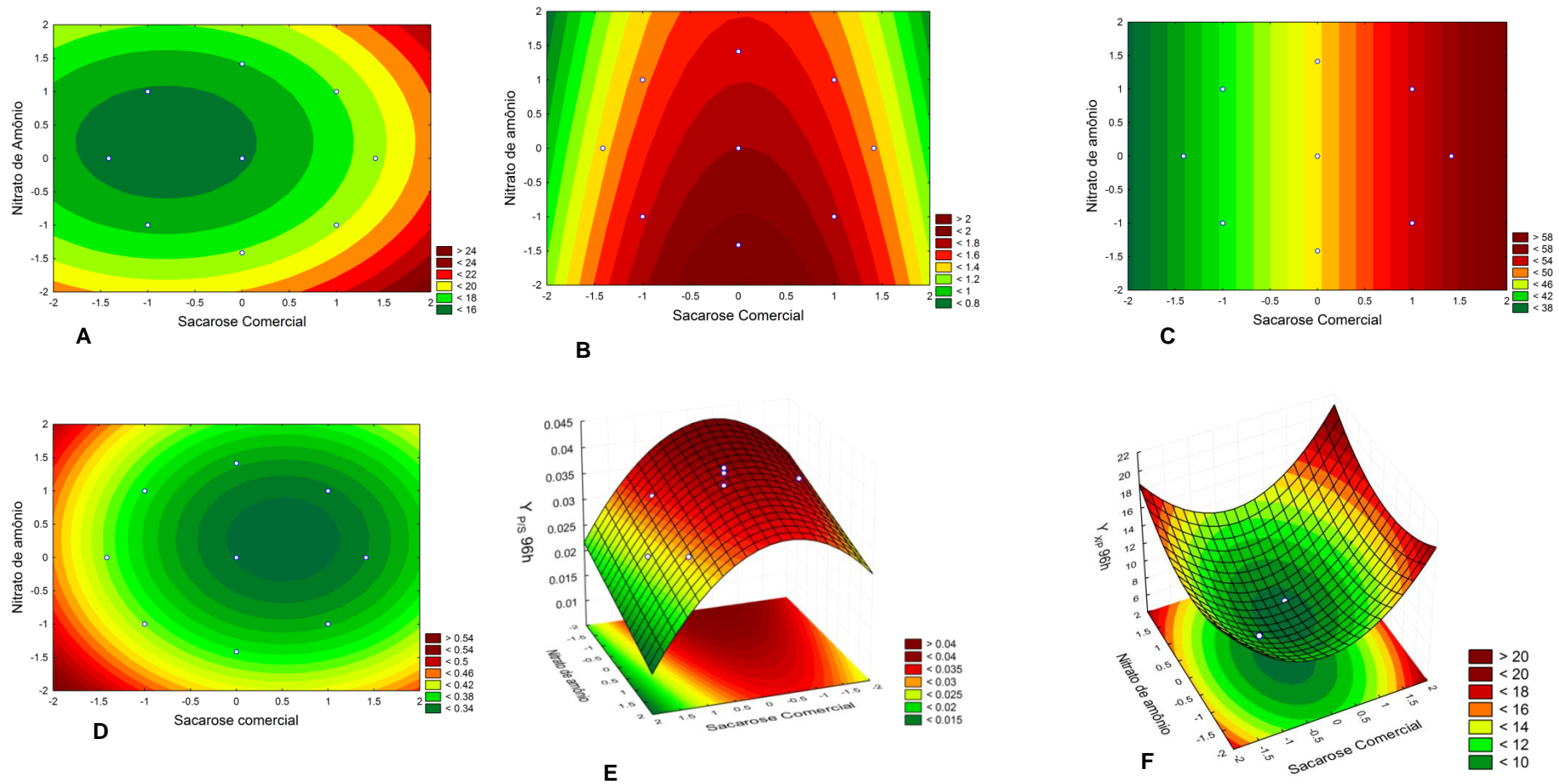


Figura 8: Superfície de Resposta da concentração de biomassa (A), de EPS (B), ART consumido (C), $Y_{X/S}$ (D), $Y_{P/S}$ (E) e $Y_{X/P}$ (F) na fermentação de *L. theobromae*, até 96 horas, em meio contendo diferentes concentrações de sacarose comercial e nitrato de amônio.

Portanto, observou-se que, para o intervalo testado, maior concentração de EPS foi obtido em meios contendo aproximadamente de 50 g/L de sacarose. Baixas concentrações de nitrogênio favorecem a síntese desse EPS. Também na faixa central de sacarose (em torno de 50 g/L de fonte de carbono) notou-se alta conversão de substrato consumido em produto. Na formulação de meio de cultivo correspondente ao ponto central (50 g/L de sacarose comercial e 3 g/L e nitrato de amônio) foram observadas as mais baixas razões $Y_{X/P}$, onde encontramos, portanto, as maiores relações de EPS/g de micélio seco.

Todas as respostas observadas em 96h foram influenciadas pelas variáveis no intervalo testado. Dos modelos brutos foram mantidas apenas as variáveis onde $p \leq 0,10$ (Tabela 8) e, para cada resposta, foi descrito um modelo matemático (Equações 20 a 25).

$$[Biomassa]g/L = 15,86 + 1,06.X1 + 0,66.(X1)^2 - 0,41.X2 + 0,85.(X2)^2 \quad \text{Equação 20}$$

$$[EPS]g/L = 1,80 + 0,03.X1 - 0,21.(X1)^2 - 0,11.X2 \quad \text{Equação 21}$$

$$[ARTconsumido]g/L = 47,74 + 5,53.X1 \quad \text{Equação 22}$$

$$Y_{X/S} g/g = 0,33 - 0,02.X1 + 0,02.(X1)^2 - 0,01.X2 + 0,02.(X2)^2 \quad \text{Equação 23}$$

$$Y_{P/S} g/g = 0,38 + 0,003.X1 + 0,004.(X1)^2 - 0,01.X2 + 0,02.(X2)^2 \quad \text{Equação 24}$$

$$Y_{X/P} g/g = 8,55 + 0,0.X1 + 0,02.(X1)^2 - 0,01.X2 + 0,02.(X2)^2 \quad \text{Equação 25}$$

Analisando os dados coletados em 72 e 96h nota-se que os diferentes resultados para biossíntese de EPS e biomassa estão relacionados não só com a formulação de meio escolhido, mas também com o tempo de cultivo. A concentração de biomassa e o rendimento $Y_{X/S}$ foram influenciados, em 72h, apenas pela concentração inicial de nitrogênio presente no meio. Após mais 24 h de fermentação, concentração de sacarose também passou a influenciar essas variáveis. Isso mostra o potencial descritivo da ferramenta DCCR. No entanto a resposta do micro-organismo deve ser cuidadosamente avaliada, considerando também o diferente comportamento que as células têm frente a diferentes meios de cultivo. Com a coleta em um mesmo tempo de cultivo, em diferentes formulações de meio, encontramos processos fermentativos em diferentes momentos, uma vez que cada ensaio proporciona diferente condição de crescimento. Assim, as velocidades de crescimento celular e de síntese de produto são certamente diferentes para cada condição.

Para as mesmas respostas foram calculadas as diferenças de resultados entre os tempos 72 e 96 h e a essa diferença denominou-se incremento. Dados positivos refletem respostas que aumentaram entre 72 e 96h, enquanto que dados negativos representam queda na resposta no mesmo intervalo (Tabela 9).

Tabela 9: Matriz do DCCR 2² com diferentes meios de cultivo visando produção de EPS por *L. theobromae* MMBJ, com o incremento entre os tempos de cultivo.

Ensaio	X ₁	X ₂	*Biomassa (g/L)	*EPS (g/L)	ART		Y _{X/S}	Y _{P/S}	*Y _{X/P}
					Consumido (g/L)	%			
1	-1	-1	5,4	-0,29	6,8	16	0,07	0,05	4,6
2	-1	1	6,5	-0,23	9,3	22	0,10	0,08	5,5
3	1	-1	5,2	-0,42	8,2	14	0,05	0,04	4,5
4	1	1	9,2	-0,28	16,3	29	0,10	0,08	7,1
5	-α	0	8,5	-0,05	11,9	30	0,14	0,12	6,1
6	+α	0	9,4	-0,73	20,2	34	0,07	0,04	8,8
7	0	-α	4,9	-0,25	7,7	16	0,05	0,04	3,4
8	0	+α	11,0	-0,15	18,2	37	0,15	0,12	7,3
central	0	0	6,9 ±2,5	0,2 ±0,1	15,3 ±9,6	31 ±19	0,05 ±0,04	0,04 ±0,07	3,2 ±2,0

X1=sacarose comercial, X2=nitrato de amônio, α=1,41. *resposta influenciada pelas variáveis.

Em todos os ensaios houve incremento na concentração de biomassa entre 72 e 96h. Isso indica que o fungo ainda conseguia alcançar substrato para que seu crescimento continuasse. O maior incremento na concentração de biomassa foi observado no ensaio 8, com aumento de 11 g/L de meio de cultivo em um intervalo de 24 h. Esse ensaio continha no início do cultivo 50 g/L de sacarose e 3 g/L de nitrato. Diferentemente, o ensaio 3 apresentou menor incremento de biomassa (5,2 g/L), contendo 57,1 g/L de sacarose e 2,3 g/L de nitrato.

Entre 72 e 96h as concentrações de EPS e biomassa aumentaram apenas no ensaio central (50 g/L de sacarose comercial e 3 g/L de nitrato de amônio). Isso indica que apenas nesta condição de cultivo o fungo conseguia hidrolisar a fonte de carbono tanto para polimerizar o EPS quanto para crescer. Nos outros ensaios, foi observado queda na concentração de EPS e aumento apenas da biomassa, o que sugere a utilização do próprio EPS como fonte de carbono para manutenção do crescimento fúngico. Essa observação é reforçada ao notar a porcentagem da concentração de sacarose consumida em 72 e 96h. Em 72h, uma média de 70% do açúcar inicial já tinha sido consumido e em 96 h essa média é de 96%.

A concentração de sacarose comercial (X1) e nitrato de amônio (X2) influenciaram os resultados de biomassa, EPS e Y_{X/P} no incremento entre os tempos analisados, como pode ser observado na Tabela 10, da estimativa de efeito das variáveis no incremento das respostas entre 72 e 96h.

Tabela 10: Estimativa de efeito da concentração de nutrientes no incremento de EPS e $Y_{X/P}$ entre 72 e 96h de cultivo por *L. theobromae*.

Resposta	Variável	Efeito	Erro Padrão	<i>p</i> -valor	Coefficiente Regressão
Biomassa $R^2=0,41$	Intercepto	7,31	0,53	0,000	7,31
	X2 (L)	3,41	1,29	0,025	1,70
EPS $R^2=0,81$	Intercepto	0,19	0,09	0,07	0,19
	X1 (L)	-0,28	0,12	0,05	-0,14
	X1 (Q)	-0,58	0,14	0,004	-0,29
	X2 (L)	0,08	0,12	0,51	0,04
	X2 (Q)	-0,39	0,14	0,02	-0,20
$Y_{X/P}$ $R^2=0,61$	Intercepto	3,85	0,63	0,000	3,85
	X1 (L)	1,35	1,15	0,28	0,67
	X2 (L)	3,46	1,26	0,03	1,73
	X2 (Q)	2,24	1,15	0,09	1,12

EPS = exopolissacarídeo; $Y_{X/P}$ = relação biomassa/EPS; X1= sacarose comercial, X2=nitrato de amônio; *p*-valor = nível descritivo do teste estatístico; (L)=índice linear, (Q)=índice quadrático.

No incremento, a concentração de nitrato possui influência positiva na concentração de biomassa. Aumentando essa variável, haverá um aumento na biomassa entre 48 e 72h, causando acréscimo médio de 3,4 g/L quando a concentração desse nutriente aumentava do nível (-) para o nível (+).

O incremento no rendimento também foi influenciado pelas fontes de nutrientes ($p<0,10$). A concentração inicial de carbono e nitrogênio causa impacto positivo no incremento da razão $Y_{X/P}$, ou seja, a diferença entre os rendimentos aumenta nas 24h compreendidas entre 72 e 96h de cultivo, o que indica queda de EPS e/ou aumento da concentração de biomassa nesse intervalo. O aumento do $Y_{X/P}$, nesse DCCR, pode ser explicado pela queda do EPS, discutido anteriormente. O incremento de $Y_{X/P}$ é mínimo, de acordo com o modelo matemático, em meios contendo ponto central de sacarose e a mínima quantidade de nitrato de amônio. Essas formulações, no entanto, apresentariam concentrações de EPS entre 1,4 e 1,5 g/L.

O incremento na concentração de EPS, de acordo com o teste de ANOVA ($p<0,05$), foi influenciado pela concentração de nitrogênio e carbono no meio de cultivo (Tabela 11). O aumento da concentração de sacarose inicial no meio de cultivo proporciona aumento de 0,34 g/L de EPS entre 72 e 96h, enquanto que o acréscimo de nitrogênio teve pequeno efeito negativo nessa resposta. O modelo matemático gerado permite também prever que o máximo de incremento foi de 0,2 g/L entre 72 e 96 h, no meio -0,24 carbono e 0,11 nitrogênio, próximo ao ponto central. Essa formulação prevê, no entanto, concentração máxima de 1,62 e 1,77 g/L de EPS nos tempos estudados. Em todos os ensaios, exceto para o ponto central,

houve queda na concentração de EPS entre 72 e 96h. Isso pode mostrar os diferentes momentos em que cada cultivo atravessava, apesar do momento da coleta ser o mesmo.

Tabela 11: ANOVA obtida para o DCCR 2² usando sacarose comercial e nitrato de amônio no cultivo submerso de *L. theobromae* no incremento entre os tempos 72 e 96h.

Resposta	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-valor
Biomassa R ² =0,41	X2 (L)	23,18	1	23,18	6,93	0,03
	Resíduo	33,48	10	3,35		
	Total	56,658	11			
EPS R ² =0,81	X1 (L)	0,16	1	0,16	5,51	0,05
	X1 (Q)	0,54	1	0,54	18,63	0,004
	X2 (L)	0,01	1	0,01	0,47	0,51
	X2 (Q)	0,24	1	0,24	8,33	0,02
	Resíduo	0,20	7	0,03		
	Total	1,04	11			
Y _{X/P} R ² =0,61	X1 (L)	3,63	1	3,63	1,36	0,28
	X2 (L)	19,90	1	19,90	7,48	0,03
	X2 (Q)	10,06	1	10,06	3,78	0,09
	Resíduo	21,31	8	2,67		
	Total	54,90	11			

EPS = exopolissacarídeo; Y_{X/P} = relação biomassa/produto; X1= sacarose comercial, X2=nitrato de amônio; p-valor = nível descritivo do teste estatístico; SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ: quadrado médio; F_{calc}=valor de F calculado para o teste; (L)=índice linear, (Q)=índice quadrático.

Giese e colaboradores (2006) reportaram crescimento de *B. rhodina* e *T. harzianum* Rifai em meio contendo botriosferana, uma β -D-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucana, como única fonte de carbono. Essas observações apóiam a hipótese de que o fungo *L. theobromae* também possua β -glucanases para a hidrólise do EPS e conseqüente utilização como fonte de carbono.

A superfície de resposta (Figura 9) ilustra a influência das variáveis nas respostas entre os tempos de 72 e 96 h de cultivo para biomassa (A), EPS (B) e Y_{X/P} (C).

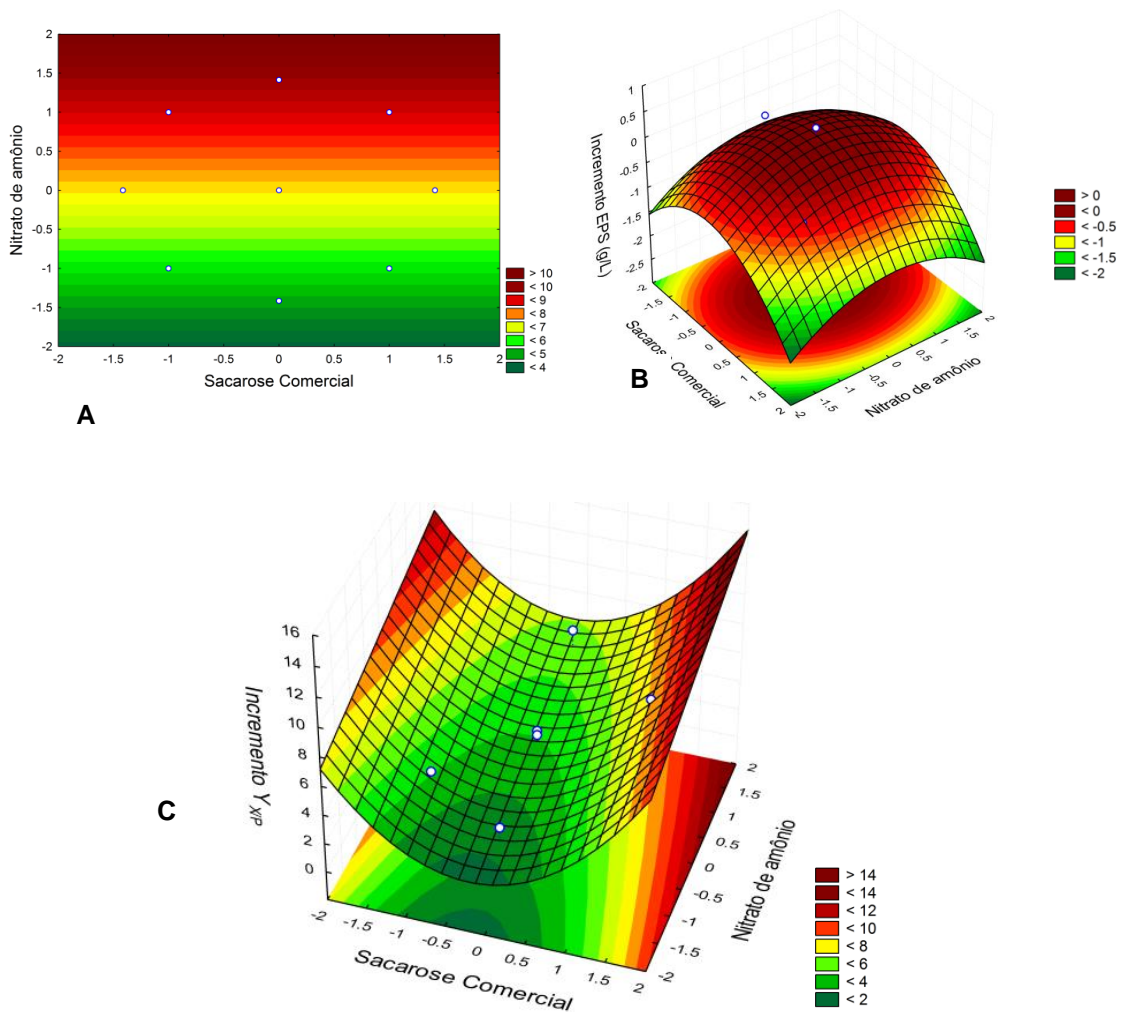


Figura 9: Diagramas de contorno e superfícies de resposta no incremento para concentração de biomassa (A), de EPS (B) e de $Y_{X/P}$ (C) na fermentação de *L. theobromae* entre 72 e 96 h, em meio contendo sacarose comercial e nitrato de amônio.

As equações dos modelos matemáticos ajustados para cada resposta (Equações 26 a 28) são apresentadas, contendo apenas as variáveis significativas para cada resposta (X_1 =sacarose comercial e X_2 =nitrato de amônio).

$$[Biomassa]g/L = 7,31 + 1,70.X_2 \quad \text{Equação 26}$$

$$[EPS]g/L = 0,19 - 0,14.X_1 - 0,29.(X_1)^2 + 0,04.(X_2) - 0,20.(X_2)^2 \quad \text{Equação 27}$$

$$Y_{X/S} g/g = 3,85 + 0,67.X_1 + 1,72.(X_1)^2 - 1,12.(X_2) \quad \text{Equação 28}$$

A partir dos resultados mostrados, pode-se notar que não há uma única condição que satisfaça a máxima produção de EPS, com mínima concentração de biomassa ou com menor concentração possível de nutrientes iniciais. Assim, para eleger o meio mais adequado para o

cultivo em bioreator, foi executado o teste de desejabilidade. Para isso, foram escolhidos critérios e seus pesos, dentro do intervalo testado (meios com formulação entre os níveis -1,41 e +1,41 de cada variável, ou seja, compreendendo formulações entre 40 e 60 g/L de sacarose comercial e entre 2 e 4 g/L de nitrato de amônio). Considerando que o incremento na produção de EPS foi nulo ou muito pequeno em 96h de cultivo, os resultados obtidos com tempo 72h foram utilizados para embasar as escolhas de formulação de meio de cultura. Assim os critérios escolhidos para otimização em bioreator foram a máxima concentração de EPS, a mínima relação $Y_{X/P}$ ou esses critérios juntos.

Os critérios geraram oito formulações de meio de cultivo diferentes. A Tabela 12 mostra os níveis dos nutrientes dos meios otimizados e as respostas (EPS, biomassa, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{X/P}$) previstas para cada formulação, e a desejabilidade de cada formulação aos critérios solicitados.

Tabela 12: Meios otimizados para síntese de EPS por *L. theobromae*.

Critério	Meio	X1	X2	EPS (g/L)	Biomassa (g/L)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/P}$	d
↑EPS	1	1,19	-1,00	2,25	11,67	0,30	0,06	5,82	1,00
	2	1,15	-1,05	2,26	11,79	0,31	0,06	5,87	1,00
	3	1,34	-0,79	2,22	12,37	0,30	0,06	5,66	1,00
	4	1,03	-1,32	2,34	12,53	0,32	0,06	6,21	1,00
	5	0,93	-1,36	2,32	12,45	0,32	0,06	6,12	1,00
↓ $Y_{X/P}$	6	1,40	1,4	2,09	6,58	0,21	0,06	4,10	0,76
↑EPS 3*	7	1,41	-0,52	2,16	10,66	0,29	0,06	5,46	0,65
↓ $Y_{X/P}$ 3*	8	1,41	-0,45	2,15	10,50	0,28	0,06	5,41	0,65

d=desejabilidade; coeficientes de rendimento em (g/g).

Observando os resultados previstos para os meios otimizados, pode-se notar que a conversão de substrato em EPS foi predita como 0,06 g/g em todas as formulações ótimas. Quando o critério fixado foi máximo $Y_{P/S}$, uma grande quantidade de meios foram propostos, todos eles com $Y_{P/S}$ iguais a 0,06 g/g. As concentrações de EPS para esses ensaios otimizados, no entanto, variavam entre 1,5 e 2,3 g/L.

Quando o critério foi $Y_{X/P}$ mínimo, cinco diferentes meios foram propostos pelo programa, mas a maior concentração de EPS predito para esses ensaios foi de 2,1 g/L, inferiores aos obtidos com outros critérios. Além disso, essa condição era satisfeita com, pelo menos, 59,9 g/L de sacarose inicial.

Dos meios otimizados, os ensaios 4 e 5 se destacaram pelas altas concentrações de EPS previstos (2,43 e 2,32 g/L, respectivamente). Para confirmar a resposta do fungo em cultivo nestes meios, 8 frascos de cada formulação foram preparados, inoculados e cultivados

a 28°C e 180 rpm. Quatro frascos foram avaliados em 72h e quatro frascos em 96h. Procedeu-se avaliação das replicatas para as respostas (Tabela 13).

Tabela 13: Resultado da validação do cultivo de *L. theobromae* em dois meios otimizados

Ensaio	Biomassa (g/L)	EPS (g/L)	ART cons.	% ARTcons.	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/P}$
Meio 4 72 h	11,4 ±	2,1 ±	37,3 ±	0,7 ±	0,3 ±	0,06 ±	5,5 ±
	0,4	0,2	1,8	0,03	0,02	0,01	0,6
Meio 4 96 h	19,0 ±	1,9 ±	53,3 ±	0,9 ±	0,4 ±	0,04 ±	10,1 ±
	0,8	0,2	1,4	0,02	0,01	0,00	1,1
*Meio 5 72 h	12,5 ±	2,2 ±	47,3 ±	0,9 ±	0,3 ±	0,05 ±	5,8 ±
	0,4	0,3	0,7	0,01	0,00	0,01	0,9
Meio 5 96 h	19,1 ±	1,9 ±	51,7 ±	0,9 ±	0,4 ±	0,04 ±	10,0 ±
	2,2	0,1	0,4	0,01	0,04	0,00	0,6

EPS= exopolissacarídeo; ART= açúcar redutor total; cons.= consumido; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ =conversão de substrato em produto; $Y_{X/P}$ = relação biomassa/produto; *= condição otimizada escolhida para cultivo em bioreator.

A formulação do meio 4 (1,03 C e -1,32 N) corresponde ao meio contendo 57,3 g/L de sacarose comercial e 2,06 g/L de nitrato de amônio. O meio 5 (0,93 C e -1,36 N) foi composto de 56,6 g/L de sacarose comercial e 2,03 g/L de nitrato de amônio. Pode-se notar que a diferença entre os meios está, fundamentalmente, na concentração da fonte de carbono.

O meio 4 proporcionou crescimento mais lento quando comparado ao meio 5, o que pode ser confirmado pela porcentagem de sacarose comercial consumida e pela concentração de biomassa em 72 h. Como nos experimentos dos DCCR, a concentração de caiu entre 72 e 96 h. A formação de produto até 72 h foi mais proeminente no meio de cultivo número 5.

Embora a concentração de EPS previsto para os meios 4 e 5 fosse, respectivamente, 2,33 e 2,32 g/L e os resultados obtidos estivessem no intervalo de predição do modelo (Equação 18), o teste ANOVA nas replicatas da validação mostrou que os meios 4 e 5 não diferem quanto à obtenção de polissacarídeo em 72h ($p=0,67$). Assim, entre os meios otimizados eleitos para validação, foi escolhido o meio de cultivo número 5 (0,93 C e -1,36 N), composto de 56,6 g/L de sacarose comercial e 2,03 g/L de nitrato de amônio. A escolha se deve, além da maior concentração de EPS previsto, pela menor concentração inicial de sacarose para obter em torno de 2,2 g/L de EPS nos cultivos em agitador orbital. Esse meio de cultivo foi usado nos testes em bioreator para avaliar demanda de oxigênio e demais parâmetros fermentativos.

5.1.3 Avaliação reológica em regime oscilatório do caldo fermentado cultivado em agitador orbital

Caldo fermentativo com e sem células, obtidos pelo cultivo em agitador orbital de *L. theobromae*, foram avaliados em Reômetro HAAKE MARS II e sensor C60/2°TiL através de experimentos dinâmicos oscilatórios.

As frequências de 1, 5 ou 10 Hz foram usadas no teste de varredura de tensão. Destas, a frequência mais adequada para esse fluido foi de 1 Hz (demais dados não mostrados).

Para avaliar o comportamento viscoelástico das amostras, foi analisado o efeito da variação de tensão sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') (Figura 10). A estrela apresentada indica a tensão de cisalhamento escolhida para as avaliações seguintes correspondente a 0,08 ou 0,04 Pa. Barra de erros mostra desvio padrão em função das triplicadas analisadas.

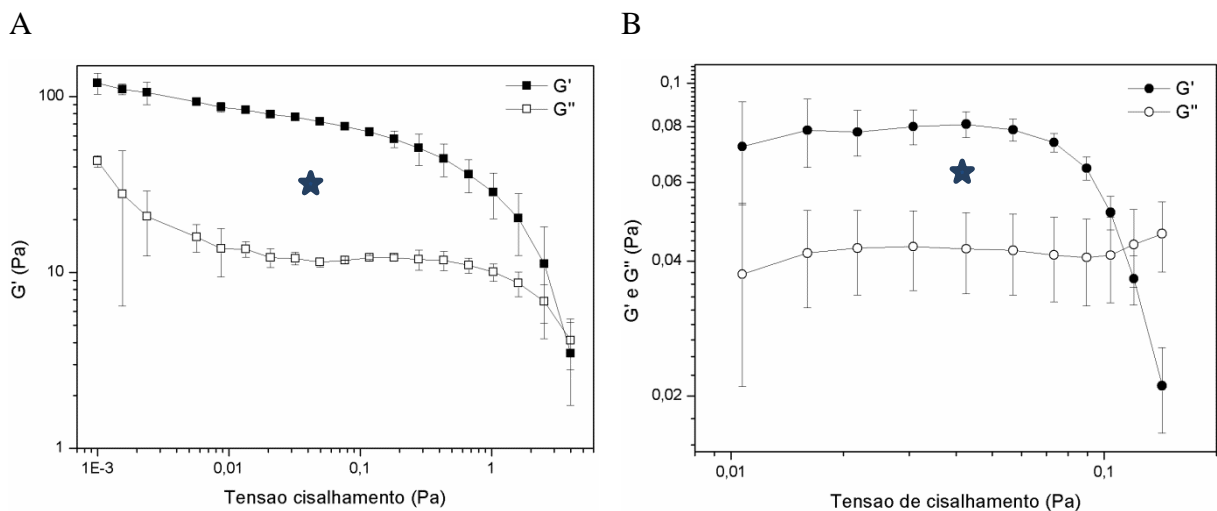


Figura 10: Varredura de tensão em amostras de A) caldo com células e B) caldo sem células (4000 g, 30 min). Ensaios obtidos a 1 Hz. Estrela indica tensão escolhida dentro da região viscoelástica para as avaliações seguintes (0,08 em A ou 0,04 Pa em B).

A varredura de tensão mostra a região em que os módulos G' e G'' estão paralelos, chamada de região viscoelástica, ou seja, região onde a estrutura do gel é preservada, e G' e G'' são independentes da frequência aplicada. Dentro dessa região foi escolhida a tensão para os próximos testes. A justificativa da escolha da tensão dentro dessa faixa é reduzir a deformação para valores inferiores a 10%, estando de acordo com a faixa utilizada na análise reológica de cada fluido (RIDOUT; BROWNSEY; MORRIS, 1998). Para o caldo com células,

a tensão escolhida foi de 0,08 Pa, enquanto que para o caldo sem células, essa tensão foi de 0,04 Pa.

Percebe-se que o caldo com ou sem células apresentaram propriedades físicas diferentes. O fluido com células apresentou G' e G'' mais altos que aqueles apresentados no caldo sem células, quando observados um mesmo intervalo de tensão.

Em seguida foi avaliada a influência da varredura de frequência (0,01 a 50 Hz) nos caldos com ou sem células (Figura 11). Apenas os dados que não apresentaram ruídos foram apresentados. Na região onde aparecem esses ruídos, naturalmente ocasionados por frequência muito altas ou muito baixas, não se pode garantir qual comportamento apresentado pela amostra. Barra de erros mostra desvio padrão em função das triplicadas analisadas.

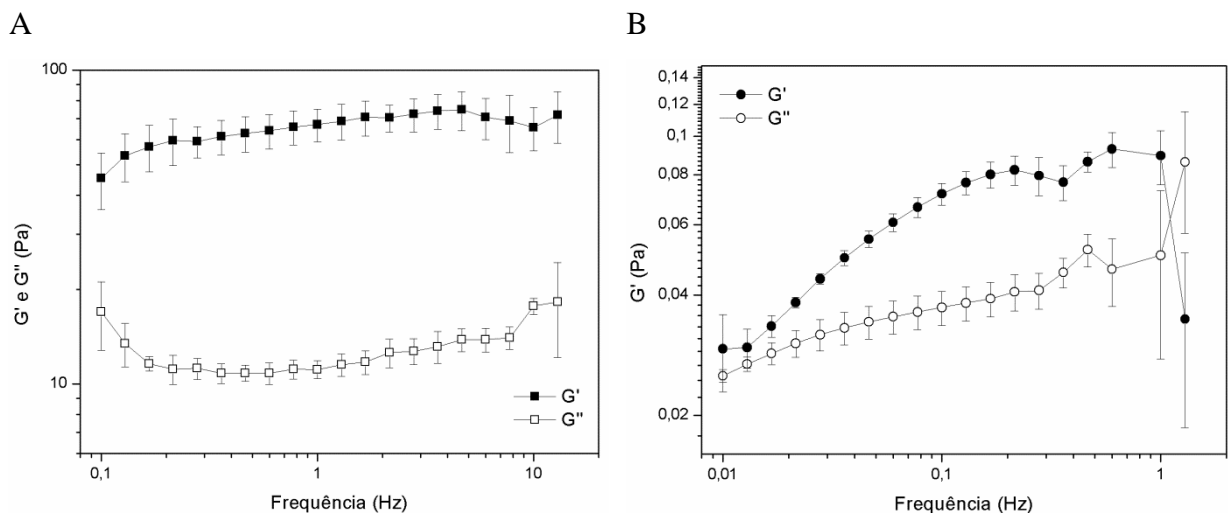


Figura 11: Varredura de frequência nas amostras de A) caldo com células e B) caldo sem células (4000 g, 30 min). Ensaio realizado a 25°C, nas tensões de 0,08 Pa ou 0,04 Pa para amostras com ou sem célula, respectivamente.

A varredura de frequência mostrou, para o caldo com células, que no intervalo entre 0,1 e 10 Hz os valores de G' e G'' foram praticamente paralelos (Figura 11, A). Nessa faixa os valores de G' foram superiores aos valores de G'' , apresentando portanto comportamento de gel. Esse comportamento de gel, de acordo com Lapasin e Pricl (1995), pode ser considerado verdadeiro quando a razão G'/G'' é maior que 3. No caldo com células essa razão foi de no mínimo 4, caracterizando um gel forte (Tabela 14). Para o caldo sem células, o módulo elástico também foi superior ao módulo viscoso no intervalo testado (Figura 11, B). Em frequências acima de 1 Hz houve inversão dessa relação. Diferentemente da amostra com

células, a razão G'/G'' apresentou valores em torno de 2, tendo característica mais próxima à uma solução concentrada ou de gel fraco (Tabela 14).

Tabela 14: Variação do módulo elástico (G') das amostras de caldo com e sem células em diferentes frequências.

Frequências (Hz)	Caldo com células		Caldo sem células	
	G' (Pa)	G'/G'' (-)	G' (Pa)	G'/G'' (-)
0,1	53,4	4,0	0,07	2,0
0,2	59,8	5,4	0,08	2,0
0,3	59,3	5,3	0,08	1,9
0,5	62,9	5,8	0,08	1,7
0,6	64,2	5,9	0,09	2,0
1,0	67,1	6,0	0,09	1,8

É importante observar a grande diferença dos valores do módulo elástico e plástico entre os dois fluidos. No caldo com células, o módulo apresentou valores entre 20 e 60 Pa, enquanto que, no caldo sem células, esses valores foram bem inferiores, entre 0,04 e 0,09 Pa.

A influência da taxa de cisalhamento na tensão de cisalhamento (Figura 12 A, curva de fluxo) e na viscosidade (Figura 12 B, curva de viscosidade). Barra de erros mostra desvio padrão para as triplicadas analisadas.

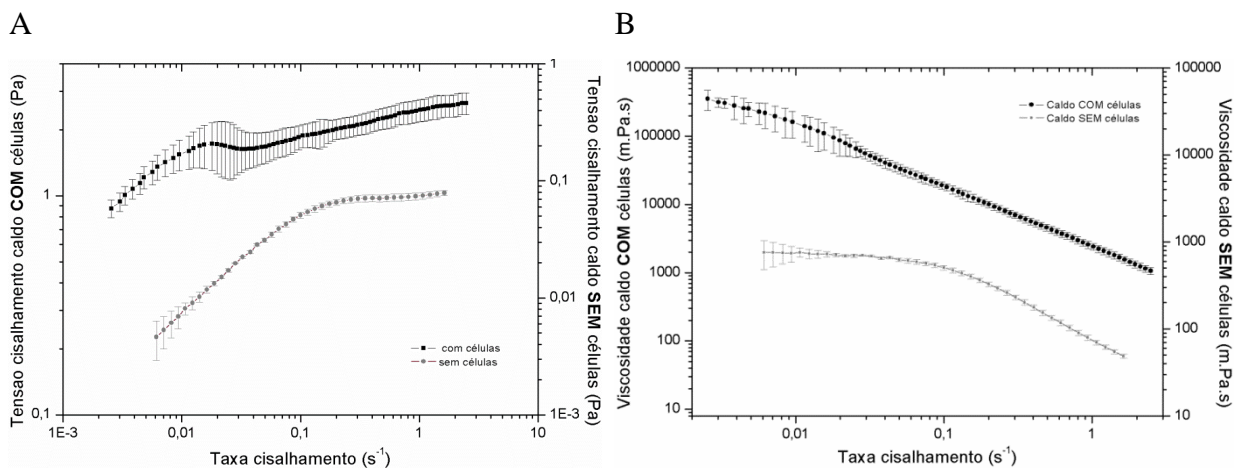


Figura 12: Curva de fluxo (A) e viscosidade aparente (B) do caldo fermentado de *L. theobromae* com e sem células (4000 g, 30 min), cultivado em frascos agitados.

Na curva de fluxo, ambos fluidos apresentavam curva com características pseudoplásticas, onde o aumento da taxa de cisalhamento causa o mesmo efeito na tensão de cisalhamento. Nota-se que a tensão lida nos fluidos, no mesmo intervalo, foram distintas. O fluido com células alcançou valores próximos a 2 Pa. O fluido sem células apresentou tensão máxima de 0,08 Pa. O intervalo de taxa de cisalhamento usado no teste, permitiu simular

resposta dos fluidos em diferentes situações, desde baixas taxas simulando condições de armazenamento até taxas relacionadas a agitação e mistura, importantes no estudo de fluidos fermentativos. Uma vez que a única diferença entre esses fluidos são os filamentos do fungo, percebemos que grande parte da resistência conferida ao fluido vem das células. Também foi observada diferença na viscosidade dos fluidos. Nesse teste os dois fluidos, novamente, apresentaram características típicas de pseudoplasticidade, onde a viscosidade decresce em função do aumento da taxa de cisalhamento. Em uma mesma taxa de cisalhamento, a razão entre a viscosidade do caldo centrifugado e bruto chega a 200×. Em bioprocessos, descobrir características físicas dos caldos fermentados com ou sem células é de fundamental importância para correto dimensionamento de bioreatores, de pás agitadoras, e do tempo de mistura adequado para manter a quantidade de OD no meio de cultivo, garantindo que a produtividade do cultivo se mantenha.

Outros parâmetros reológicos, como o índice de comportamento (η) e o índice de consistência (κ) também se fazem necessários. Para determinação desses parâmetros, os dados da curva de fluxo foram ajustados em modelos não lineares aos modelos reológicos de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley (Tabela 15).

Tabela 15: Parâmetros reológicos calculados pelos modelos de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley para caldo fermentado com e sem células

Parâmetros de ajuste	Caldo COM células		Caldo SEM células	
	Ostwald	Herschel	Ostwald	Herschel
κ (Pa.s ^{η})	2,28	-	0,08	0,02
Erro κ (Pa.s ^{η})	0,03	-	2x10 ⁻⁴	0,01
η (-)	0,12	-	0,07	0,33
Erro η (-)	4x10 ⁻³	-	5x10 ⁻³	0,20
τ_0 (Pa)	*	-	*	0,06
Erro τ_0 (Pa)	*	-	*	9x10 ⁻³
χ^2	0,05	-	6x10 ⁻⁷	6x10 ⁻⁷
SQR	6,32	-	7x10 ⁻⁶	7x10 ⁻⁶
R ²	0,89	-	0,96	0,96

sendo κ =índice de consistência; η =índice de comportamento; τ_0 =tensão inicial; *=não se aplica; -=dados não ajustáveis ao modelo.

A bondade do ajuste dos dados empíricos aos modelos matemáticos propostos (item 4.8.9) pode ser avaliada pelos índices χ^2 , SQR, e R². Para o caldo com células o modelo de Herschel-Bulkley não pôde ser empregado. A partir do ajuste com o modelo de Ostwald-de-Waele, pode-se inferir que $\eta=0,12$, confirmando comportamento pseudoplástico do caldo com células. Esse comportamento foi observado em cultivos de fungos filamentosos de outros

autores (KRULL et al., 2013; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; RILEY et al., 2000; WUCHERPFENNIG et al., 2010). Os caldos sem células também apresentaram pseudoplasticidade ($\eta=0,07$ e $\eta=0,33$) no caldo sem células. O ajuste dos modelos para o caldo sem células apresentaram bom coeficiente de correlação. O ajuste de Herschel-Bulkley, no entanto, mostrou altos erros para a tensão inicial e para os índices de comportamento e consistência. Assim, o modelo de Ostwald-de-Waele foi o mais adequado para ambos fluidos. O modelo de Ostwald-de-Waele é mais simples que o modelo de Herschel-Bulkley, tendo vantagem de ser mais facilmente aplicado para cálculos de engenharia.

A Figura 13 mostra o efeito da temperatura de aquecimento (de 5 a 30°C) e resfriamento (de 30 a 5 °C) no caldo fermentado com e sem células

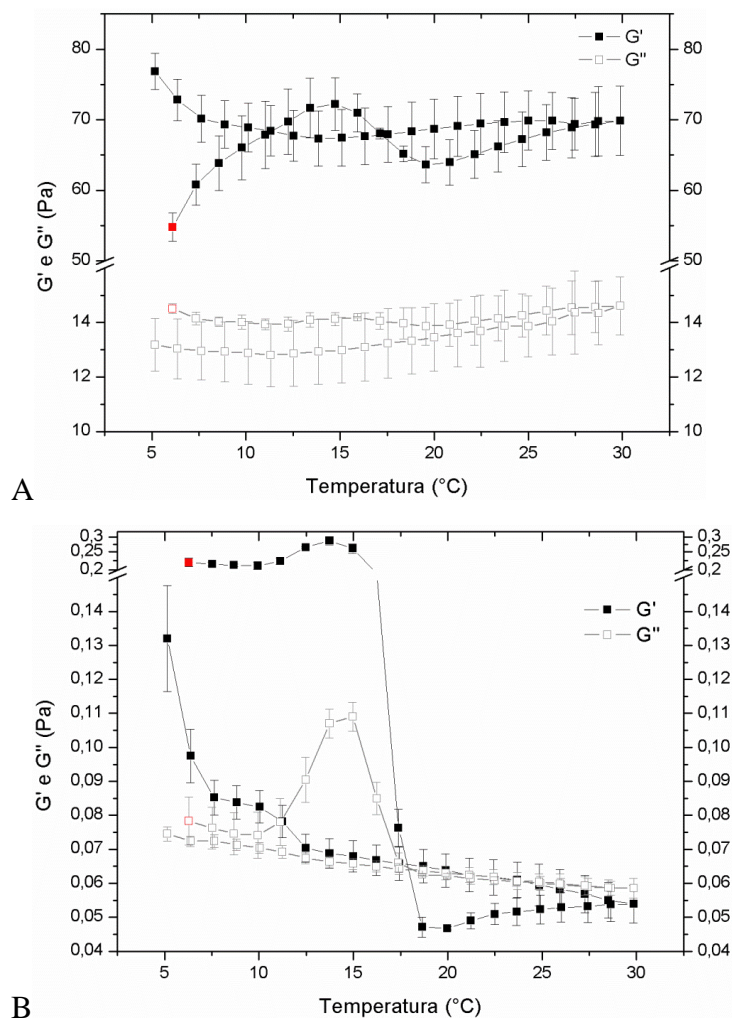


Figura 13: Efeito da temperatura nos módulos G' e G'' das amostras de caldo fermentado com (A) ou sem células (B). Amostra foi submetida a aquecimento (de 5 a 30°C) e resfriamento (30 a 5°C) numa velocidade de 2°C/min. Coletas em 1 Hz de frequência e tensão de 0,08 ou 0,04 Pa. Pontos vermelhos indicam início do teste.

No caldo com células (Figura 13, A), verifica-se que com o aumento ou decréscimo da temperatura o caldo de fermentação manteve as características de gel e os módulos elástico e viscoso praticamente não sofreram variação no intervalo de temperatura testado. Pequena diferença pôde ser observada em baixas temperaturas para o módulo G' . No caldo sem células (Figura 13, B), houve grande queda dos valores dos módulos G' e G'' , quando comparada à amostra com células. G' , que apresentou valores em torno de 70 Pa, no caldo sem células caiu para valores entre 0,25 e 0,05 Pa. Além disso, pode ser observada que a característica de gel do caldo com células se perdeu. Após início do teste, os valores de G' e G'' ficam próximos, e em alguns momentos iguais.

A Tabela 16 ilustra a influência da temperatura na característica de gel, que se perdeu à medida que as variações de temperatura foram aplicadas no caldo fermentativo sem células. Em alguns momentos o G'' superou os valores de G' , confirmado por valores da razão $G'/G'' < 1$.

Tabela 16: Relação G'/G'' para o caldo sem células ao longo do rampa de temperatura (5–30 e de 30–5°C).

	Tempo (min)	Temperatura (°C)	G' (Pa)	G'/G'' (-)
SUBIDA	5,6	6,3	0,22	2,7
	11,2	17,4	0,07	1,1
	17,5	29,9	0,06	0,8
DESCIDA	18,2	28,5	0,06	0,8
	23,8	17,4	0,06	0,9
	30,0	5,2	0,07	1,6

A variação da resposta dos caldos fermentados demonstram que a presença de células no fluido mantém as características de gel forte. O transporte de caldo fermentado é facilitado na ausência de células. A separação de células no cultivo de fungos filamentosos é feita geralmente por centrifugação (DORAN, 2013). Compreender a dificuldade de transportar esse fluido se justifica para adequar/dimensionar uma estrutura e evitar gastos desnecessários de energia para o transporte de matéria. EPS obtidos em bioprocessos, ainda no caldo bruto, apresentam características diferentes do EPS após extração com uso de solventes orgânicos. Em solução, com os nutrientes residuais da fermentação, ele apresenta viscosidades menores que no caldo com células. Portanto, centrifugar o caldo fermentado em centrífuga localizada próxima à dorna de fermentação ocasiona em economia de energia e favorece a logística para

distribuição do fluido centrifugado até a área de extração e purificação (BASMADJIAN, 1999; TODARO, 1996).

A caracterização reológica minuciosa de caldos fermentativos, envolvendo por exemplo experimentos dinâmicos oscilatórios, não é freqüente na literatura. Os pesquisadores geralmente relacionam a viscosidade aparente em diferentes taxas de cisalhamento com a morfologia do fungo. Uma vez que a descrição reológica desse fluido é recente, o estudo deste e de outros fluidos fermentativos pode auxiliar na caracterização e ampliação de escala para bioprocessos usando fungos filamentosos.

5.1.4 Caracterização estrutural e química do EPS produzido por *L. theobromae*

O EPS foi produzido (itens 4.1.2 e 4.1.3), dialisado e liofilizado para início das avaliações de caracterização química e estrutural. A concentração de EPS obtido no caldo fermentado após 72 h foi de 2,2 g/L. O fracionamento completo das estruturas presentes do EPS de *L. theobromae* deu origem a três polissacarídeos distintos (Figura 14). Como primeira etapa de purificação, a fração contendo os EPS foi submetida ao fracionamento pelo método de congelamento e posterior degelo. O fracionamento deu origem a duas frações: uma insolúvel em água fria, de maior rendimento (67% p/p), denominada fração PEPS (EPS precipitado) e uma fração de polissacarídeos solúveis em água fria (fração SEPS, EPS solúvel), correspondente a 25% (p/p) do polissacarídeo bruto produzido em cultura submersa.

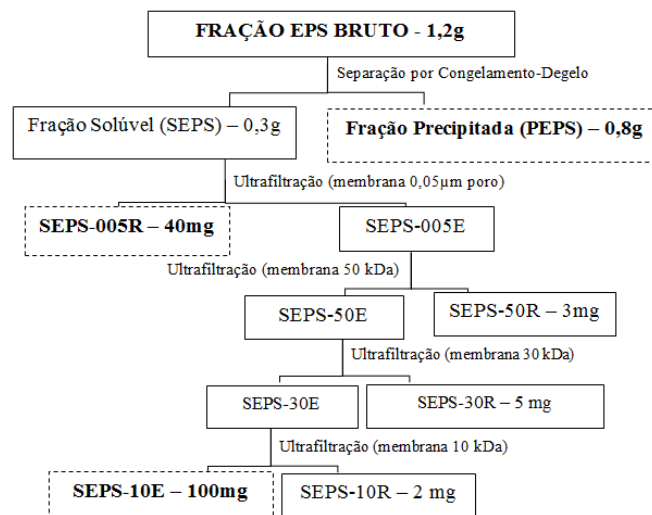


Figura 14: Esquema do fracionamento dos EPS obtidos por *L. theobromae*. **R** indica fração retida e **E** indica fração eluída na membrana de ultrafiltração.

As frações SEPS e PEPS foram avaliadas quanto à sua composição monossacarídica (Tabela 17). Os resultados indicam que as duas frações eram compostas principalmente por glicose.

Tabela 17: Composição monossacarídica das frações de polissacarídeos PEPS e SEPS, obtidos do EPS produzido por *L. theobromae* em cultivo submerso

Fração	Monossacarídeos						
	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glicose
PEPS	-	3,2	2,7	-	5,1	14,4	74,4
SEPS	-	-	1,8	-	tr	6,8	90,2

O peso molecular e a Homogeneidade da fração SEPS foi determinado por HPSEC (Figura 15) dando origem a um pico que eluiu em torno de 42 minutos (polímero de alto peso molecular) e a um segundo pico que eluiu em torno de 62 minutos (polímero de baixo peso molecular).

Para separar esses polissacarídeos distintos, a fração SEPS foi submetida a sucessivas ultrafiltrações em membranas de diferentes porosidades (0,05 μm ; 50kDa, 30kDa e 10kDa, Millipore®). O polímero de maior peso molecular ficou retido na membrana de 0,05 μm , dando origem à fração SEPS-005R (Figura 15), de peso molecular igual a $1,8 \times 10^6$ Da, enquanto o polissacarídeo de menor peso molecular ($7,0 \times 10^3$ Da) foi eluído na membrana de 10kDa (fração SEPS-10E).

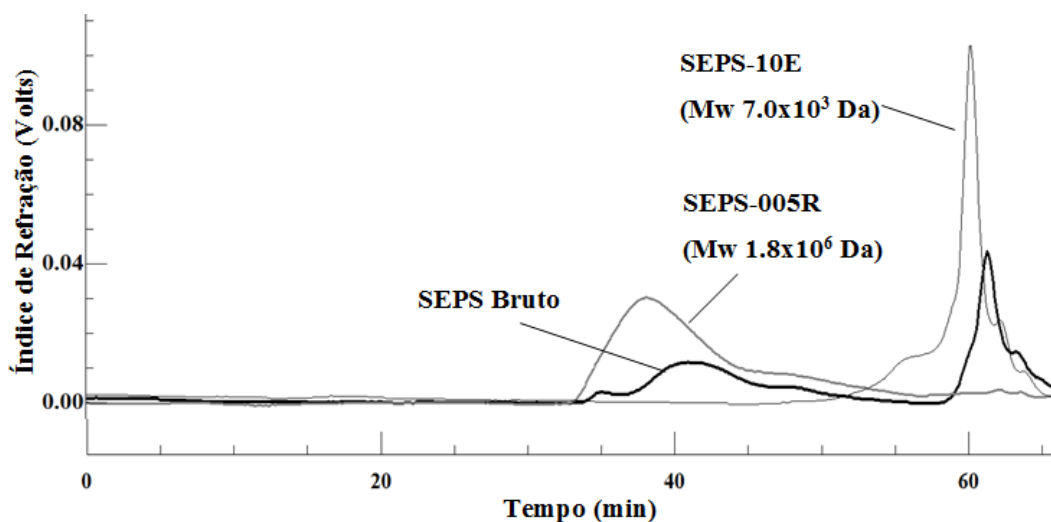


Figura 15: Perfil de eluição em HPSEC da Fração SEPS bruta e das frações purificadas SEPS-005R e SEPS-10E, utilizando detector de índice de refração.

Para estabelecer uma comparação, a fração SEPS-005R tem quase metade do peso molecular da proteína humana Titina, a maior proteína conhecida, com peso molecular entre $3-3,7 \times 10^6$ Da (3–3,7 MDa) e fórmula molecular $C_{169719}H_{270466}N_{45688}O_{52238}S_{911}$ (OPITZ et al., 2003). De acordo com nosso levantamento, o polissacarídeo SEPS-005R purificado neste trabalho é a maior β -glucana-(1 \rightarrow 6) descrita na literatura.

A análise de RMN- ^{13}C das frações SEPS-005R e SEPS-10E mostraram espectro similares, sugerindo a presença de polissacarídeos de mesma estrutura, mas de tamanhos distintos. O HSQC 1H - ^{13}C da fração SEPS-005R está ilustrado na Figura 16 (A) e demonstra a presença de seis sinais indicando um polímero linear. O sinal anomérico em δ 103,3 (C-1) foi atribuído às unidades de β -D-glucopiranose. Além disso, a configuração anomérica foi confirmada pelo valor de J_{H1-H2} (7,3 Hz) observado no espectro RMN 1H (BI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2000).

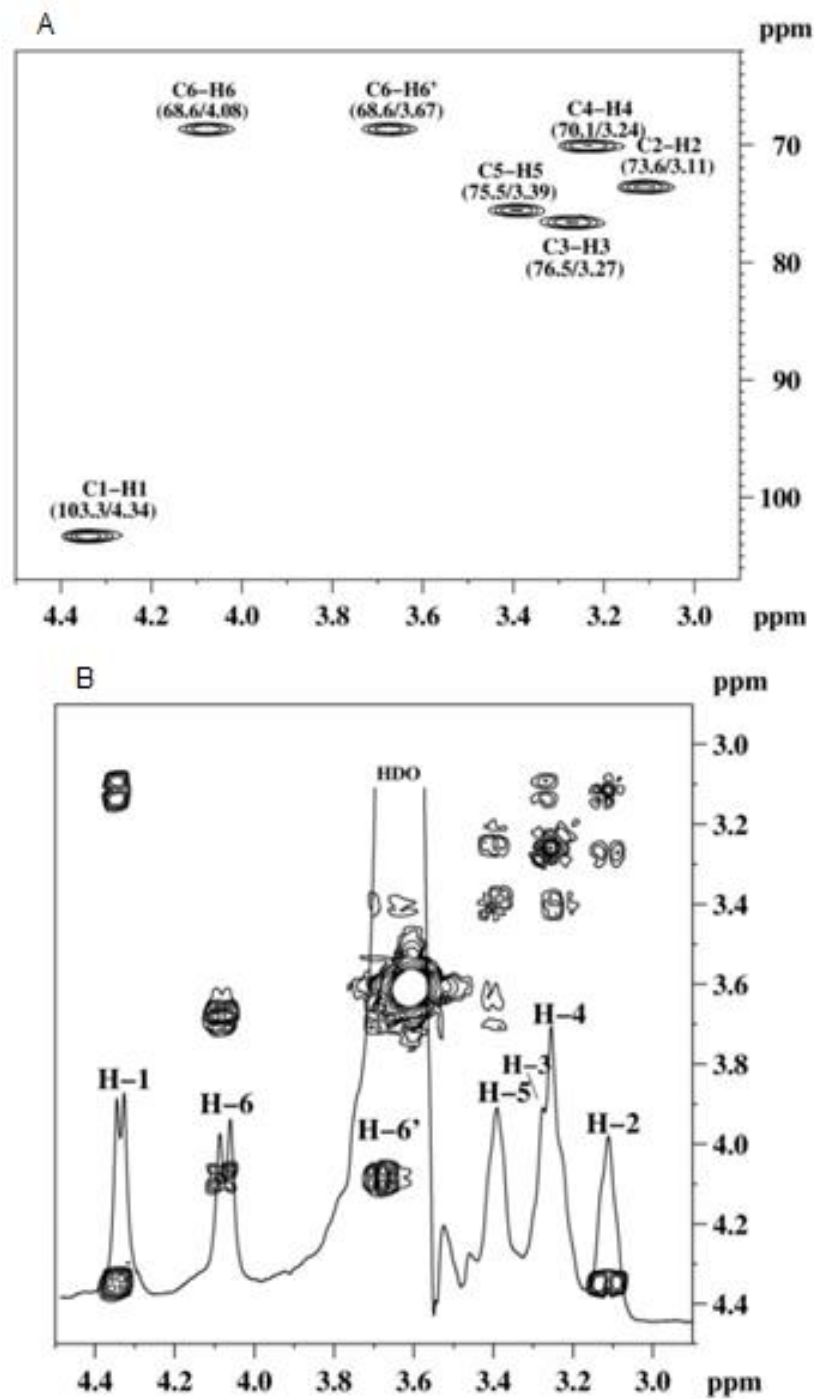


Figura 16: (A) Espectro HSQC ^1H - ^{13}C mostrando assinalamentos de carbono e hidrogênio e (B) Espectro RMN ^1H e COSY ^1H - ^1H mostrando o assinalamento de hidrogênio de uma β -D-glucana-(1 \rightarrow 6) linear presente na fração SEPS-005R de *L. theobromae*. Amostra foi dissolvida em DMSO- d_6 e os dados foram coletados à temperatura de 50°C.

No experimento 2D COSY ^1H - ^1H (Figura 16, B) o acoplamento de todos os hidrogênios pertencentes ao anel puderam ser observados. O sinal anomérico em δ 4,34 acoplou com um sinal em δ 3,11 (H-2) e este com um sinal em δ 3,27 correspondente ao H-3.

O acoplamento entre esse hidrogênio e o H-4 foi visto em δ 3,24 (H-4), e entre este e o H-5 em δ 3,39. Finalmente, o H-5 acoplou com os dois hidrogênios do H-6 em δ 4,08/3,67. Desta maneira, conhecendo o deslocamento químico de todos os hidrogênios do anel, seus carbonos correspondentes também puderam ser localizados no espectro HSQC ^1H - ^{13}C (Figura 16 A). No espectro de HSQC ^1H - ^{13}C , os hidrogênios H-6 e H-6' acoplaram com seu carbono em δ 68,6. O deslocamento para campo baixo desse carbono mostrou que as unidades de β -D-glicose possuem ligação em O-6 (GORIN e MAZUREK, 1975).

Os resultados de RMN resumidos acima mostram que a fração SEPS-005R e a fração SEPS-10E contém β -D-glucana-(1 \rightarrow 6) lineares (Figura 17).

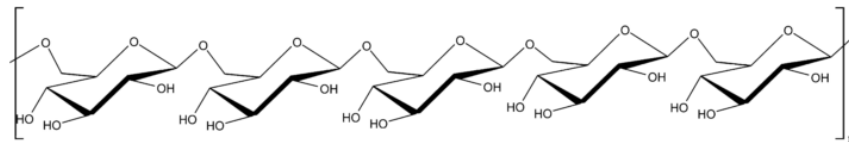


Figura 17: Estrutura da β -glucana-(1 \rightarrow 6) produzida por *L. theobromae*. Para SEPS 005R $n=2.000$ ($1,8 \times 10^6$ g/mol) e para SEPS 10E $n=8$ (7×10^3 g/mol). Fonte ilustração: Vasconcelos e colaboradores (2008).

As glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 6) são repetidamente reportadas no corpo de frutificação de basidiomicetos, obtidas extrações aquosas à quente (BHANJA et al., 2012; BI et al., 2009; NANDAN et al., 2008; SMIDERLE et al., 2011) ou alcalinas de ascomicetos (obtida neste trabalho). Monteiro e colaboradores (2000) reportaram, pela primeira vez, a presença de uma β -glucana-(1 \rightarrow 6) em *Actinobacillus suis* obtida em cultivo submerso. Embora essa estrutura tenha sido mais encontrada na parede de leveduras, Osaku e colaboradores (2002) obtiveram essas glucanas no cultivo submerso de *Thelephora terrestris*.

A Tabela 18 mostra a relação entre tamanho de cadeias de β -glucanas-(1 \rightarrow 6) obtidas por cultivo submerso ou da extração alcalina de micélios ou corpo de frutificação, comparada às glucanas SEPS obtidas neste trabalho. Foi possível perceber que a β -D-glucana-(1 \rightarrow 6) com maior peso molecular já descrita foi a glucana isolada neste trabalho (SEPS-005R), com peso molecular de 1800 kDa (ou $1,8 \times 10^6$ g/mol). Este valor mostrou-se 3 vezes superior à glucana obtida por Gonzaga e colaboradores (2005). O potencial biológico dessa molécula está sendo explorado por nosso grupo (DIBASTIANI, dissertação de mestrado em andamento).

Tabela 18: Obtenção de β -glucana-(1 \rightarrow 6) por micro-organismos e suas respectivas fontes, em ordem crescente de tamanho de cadeia.

Tamanho	Micro-organismo	Fonte	Filo	Referência
-	<i>Actinobacillus suis</i>	cápsula	Proteobacteria	MONTEIRO et al., 2000
-	<i>Armillariella tabescens</i>	CF	Basidiomycota	KIHO et al., 1992
-	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EPS	Ascomycota	VASCONCELOS et al., 2008
-	<i>Guignardia citricarpa</i>	EPS	Ascomycota	SASSAKI et al., 2002
-	<i>Umbilicaria mammulata</i>	líquen	Ascomycota	CARBONERO et al., 2006
2,6 kDa	<i>Bulgaria inquinans</i>	CF	Ascomycota	BI et al., 2009
7 kDa	<i>L. theobromae</i>	EPS	Ascomycota	Este trabalho
11 kDa	<i>Thelephora terrestris</i>	EPS	Basidiomycota	OSAKU et al., 2002
29 kDa	<i>Agaricus bisporus</i>	CF	Basidiomycota	SMIDERLE et al., 2011
45 kDa	<i>Agaricus brasiliensis</i>	CF	Basidiomycota	SMIDERLE et al., 2011
180 kDa	<i>Termitomyces robustus</i>	CF	Basidiomycota	BHANJA et al., 2012
180 kDa	<i>Agaricus bitorquis</i>	CF	Basidiomycota	NANDAN et al., 2008
575 kDa	<i>Agaricus blazei</i>	CF	Basidiomycota	GONZAGA et al., 2005
1800 kDa	<i>L. theobromae</i>	EPS	Ascomycota	Este trabalho

Outra fração de polissacarídeo (PEPS) foi obtida a partir do EPS bruto produzido por *L. theobromae*. Essa fração corresponde à fração insolúvel em água fria após separação por congelamento e degelo e apresentou maior rendimento (67%).

Essa fração foi avaliada quanto à composição monossacarídica, espectrometria (RMN- ^{13}C , DEPT- ^{13}C e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$), metilação e degradação de Smith. O espectro RMN- ^{13}C (Figura 18, A) da fração PEPS mostra que se trata de uma glucana com anomeridade β devido ao sinal de C1 em campo baixo, δ 103,2 ppm. Os sinais em δ 86,9 e 86,3 referem-se ao C-3 substituído. O espectro de DEPT-135 (Figura 18, B) mostrou a inversão dos sinais em δ 68,5 (indicando a presença de C-6 substituído) e em δ 61,3; 61,1 e 61,0 (indicando a presença de C-6 livres) (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983; GIDLEY; NISHINARI, 2009; SMIDERLE, 2012). Desta maneira, pode-se sugerir a presença de uma β -glucana (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) ligada.

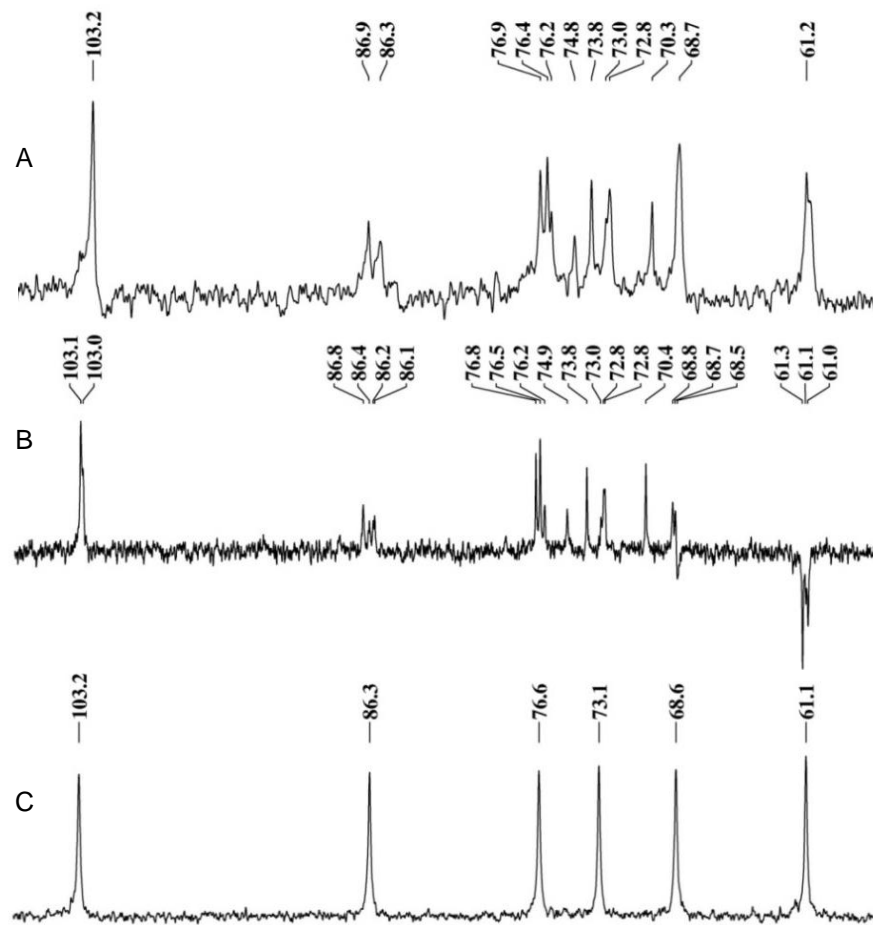


Figura 18: (A) Espectro de RMN- ^{13}C da β -D-glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) presente na fração PEPS (B) experimento de DEPT-135 e (C) polissacarídeo PEPS-SM obtido por degradação controlada de Smith. Amostras foram dissolvidas em DMSO- d_6 e dados foram coletados a 50°C.

Para determinar a estrutura da cadeia principal dessa glucana, foi realizada a degradação controlada de Smith por 96h, resultando na amostra PEPS-SM. O perfil de RMN- ^{13}C (Figura 18, C) desta amostra mostrou a presença de apenas seis sinais em δ 103,2 (C-1); 86,3 (C-3); 76,6 (C-5); 73,1 (C-2); 68,6 (C-4) e 61,1 (C-6), característicos de uma glucana β -(1 \rightarrow 3) linear.

A fração PEPS foi metilada e a análise dos alditóis acetato parcialmente metilados pode ser vista na Tabela 19. A presença do derivado 2,4-Me $_2$ -Glc indica unidades de glicose 3,6-di-O-substituídas, enquanto que os derivados 2,4,6-Me $_3$ -Glc e 2,3,4-Me $_3$ -Glc indicam a presença de unidades de glicose 3-O- e 6-O-substituídas, respectivamente. Estes dados demonstram a presença de uma β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) ramificada.

Tabela 19: Tipos de ligação baseados na análise de acetato de alditóis parcialmente *O*-metilados obtidos a partir da fração PEPS do *Lasiodiplodia theobromae*.

Acetato de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados	% ^a	Tipo de ligação ^b	Unidade na estrutura
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	20	Glc _p -(1→	A
2,4,6-Me ₃ -Glc	28	→3)-Glc _p -(1→	B
2,3,4-Me ₃ -Glc	32	→6)-Glc _p -(1→	C
2,4-Me ₂ -Glc	20	→3,6)-Glc _p -(1→	D

^a % da área dos picos dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados relativo à área total, determinado por GC-MS; ^b Baseado nos derivados de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados. A, B, C e D são as unidades monossacarídicas presentes na estrutura, representadas na Figura 15.

Em resumo, os resultados de composição, os dados de metilação e as análises de espectroscopia de RMN-¹³C das amostras oxidadas e não oxidadas demonstram que a fração PEPS é uma glucana tipo β -(1→3)-(1→6), com cadeia principal formada por unidades de glucopiranosose (1→3)-ligadas e substituídas em *O*-6 por resíduos de glucopiranosil e 6-*O*- β -glucopiranosil-D-glicose em dois de cada cinco resíduos da cadeia principal.

Em um cultivo em agitador orbital com *L. theobromae*, dos 2,2 g/L obtidos, 1,5 g/L correspondem à glucana do tipo β -(1→3)-(1→6). Assim, 67% (p/p) das glucanas produzidas são glucanas ramificadas, obtidas numa razão de 0,12 g PEPS/g micélio. Já para a fração SEPS, 25% (p/p) das glucanas produzidas são solúveis em água, obtidas numa razão de 0,05 g SEPS/g micélio.

Muitas glucanas do tipo β -(1→3)-(1→6) têm sido reportadas em fungos filamentosos (SILVA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008), cogumelos (CARBONERO et al., 2006b; SANTOS-NEVES et al., 2008; SELBMANN et al., 2002; SMIDERLE et al., 2006, 2008) ou líquens (CARBONERO et al., 2002; CORDEIRO; REINHARDT; IACOMINI, 2012; VASCONCELOS et al., 2008). Em basidiomicetos e ascomicetos, as β -glucanas-(1→3)-(1→6) são encontradas tanto na superfície das hifas e no corpo de frutificação, como também podem ser liberadas para o meio extracelular (HARRIS; STONE, 2009; KOGAN, 2000; REIS et al., 2002; SANTOS-NEVES et al., 2008; SMIDERLE et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2008; ZHANG et al., 2007). O grau de substituição de β -glucana-(1→3)-(1→6) com resíduos de glucopiranosose depende da fonte e das condições de cultura (STONE, 2009).

Apesar de também se tratar de uma glucana do tipo β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), a fração PEPS obtida neste trabalho apresenta cadeias laterais de glicose O-6 substituída (Figura 19) e não somente terminais não-redutores de glicose, como é comumente observado (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTÍNEZ, 1996; KOGAN, 2000; SANTOS-NEVES et al., 2008; SELBMANN et al., 2002; SMIDERLE et al., 2006, 2008; VASCONCELOS et al., 2008).

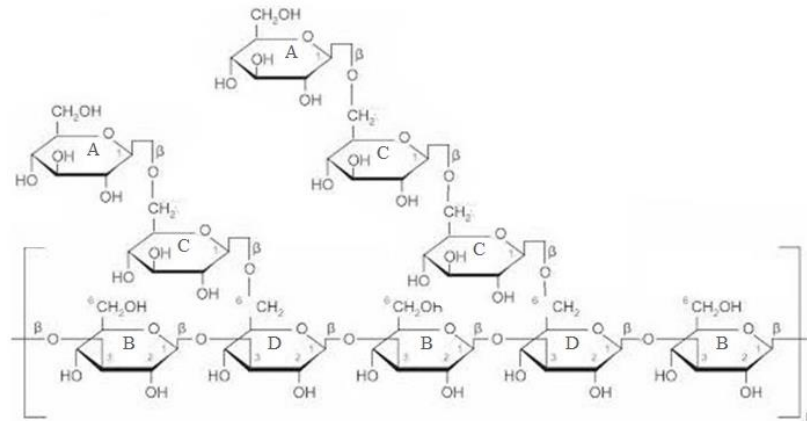


Figura 19: Provável unidade repetitiva da β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) (PEPS), um dos EPS isolados do cultivo submerso de *L. theobromae*.

A atividade biológica de glucanas de ligações β -(1 \rightarrow 3) podem variar em função de seu peso molecular e do número de ramificações. Tratamentos com esses polissacarídeos resultaram no aumento da quantidade de neutrófilos e eosinófilos e na alteração da morfologia de macrófagos (TZIANABOS, 2000). O desafio para explorar as propriedades biológicas das glucanas fúngicas é obter frações puras e de tamanhos homogêneos, para garantir uniformidade de ação e efetividade dessas moléculas. Obter glucanas pela extração aquosa de micélios de fungo é uma operação laboriosa, dando origem a extratos brutos com moléculas muito diversas. Muitas vezes esses carboidratos estão acompanhados de proteínas ou moléculas de diferentes características químicas e biológicas. Assim, a obtenção de glucanas por bioprocessos garante a homogeneidade das estruturas obtidas, com fácil purificação.

Alguns estudos mostram a atividade imunomodulatória de carboidratos insolúveis, oriundos de parede celular fúngica. No entanto, estudos se concentram em avaliar as atividades de glucanas solúveis e mensurar seu potencial clínico. Mesmo com a obtenção de moléculas insolúveis em água, é possível mudar essa solubilidade através de modificação química (MENDES et al., 2009; TZIANABOS, 2000; VASCONCELOS et al., 2013; WANG; ZHANG, 2009).

O fungo *L. theobromae* produz três diferentes glucanas, sendo duas glucanas lineares do tipo β -(1 \rightarrow 6) com pesos moleculares distintos (SEPS 005R e SEPS 10E) e uma ramificada β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6).

Em estudos de produção e caracterização química e estrutural de EPS obtidos em cultivo, apenas um tipo de estrutura é predominantemente reportado (BARBOSA et al., 2003; CUNHA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2008) enquanto poucos trabalhos mencionam a importância da cuidadosa purificação para caracterização das diferentes estruturas que são produzidas em uma mesma condição de cultivo (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTÍNEZ, 1996; SEVIOUR et al., 1992). Cadeias diferentes eram caracterizadas em um mesmo cultivo quando estavam naturalmente separadas como um IPS e um EPS (LIU; ZHANG, 2007; POKHREL; OHGA, 2007; SHIH; PAN; HSIEH, 2006).

Mesmo que muitas glucanas tenham sido descritas, apenas algumas foram rigorosamente caracterizadas (SEVIOUR et al., 1992). Para determinar a estrutura e composição do exopolissacarídeo, estes devem ser separados por processos de fracionamento, e a purificação depende da composição do material original, do grau e padrão de ramificação dos polímeros (ZHANG et al., 2007). Assim, uma possível explicação para que o número de polímeros de EPS caracterizadas em um mesmo trabalho seja, agora, mais numeroso é que o fracionamento tem sido mais cuidadosamente executado, permitindo que cada cadeia seja adequadamente caracterizada.

5.1.5 Avaliação dos compostos biomassa de *L. theobromae* cultivada em diferentes fontes de carbono

As biomassas de *L. theobromae* cultivadas em diferentes fontes de carbono foram avaliadas. Foram testadas diferentes fontes de carbono: Glicose, Frutose, Lactose, Sacarose, Sacarose Comercial e Melaço de cana de açúcar. O fungo não se desenvolveu em meio contendo lactose. Assim, as análises foram aplicadas nas biomassas obtidas a partir das demais fontes de carbono.

Amostras de biomassa seca foram submetidas à extração por solventes orgânicos (Clorofórmio:Metanol, 1:1, v/v). A diferença entre a massa antes e depois da extração orgânica corresponde ao peso dos compostos apolares em porcentagem relativa à massa seca inicial de biomassa, e os resultados são expressos na Tabela 20.

Em seguida, o resíduo da extração orgânica foi seco e usado para extração alcalina a quente (NaOH 10%, 100°C) para obtenção de carboidratos. Os resultados de carboidratos

solúveis em álcali foram expressos pela porcentagem de massa de carboidratos da fração alcalina relativa à massa inicial da biomassa seca.

Tabela 20: Composição de compostos apolares e carboidratos no micélio de *L. theobromae* cultivado em diferentes fontes de carbono.

Fonte Carbono	Micélio Seco (g)	Compostos Apolares (%)	Carboidratos extrato alcalino (%)	Fração S Solúvel em água fria (%)*	Fração P Insolúvel em água fria (%)**
Glicose	2,09	14,8	32,3	32,2	50,2
Frutose	1,15	11,8	23,7	66,7	27,9
Sacarose	1,53	10,5	29,3	48,7	39,4
Comercial	1,79	9,5	24,2	47,9	44,0
Melaço	2,22	13,4	15,9	63,9	19,6

Comercial = Sacarose Comercial; * = porcentagem de carboidratos solúveis em água fria obtidos do procedimento de congelamento e degelo do extrato alcalino; ** = porcentagem de carboidratos insolúveis em água fria obtidos do procedimento de congelamento e degelo do extrato alcalino.

O conteúdo de compostos apolares na biomassa de *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em diferentes fontes de carbono variou entre 9,5 e 14,8% (p/p).

Sumner e Morgan (1969) investigaram a quantidade de lipídeos em quatro diferentes espécies do zigomiceto *Mucorales* e obtiveram entre 3,7 e 8,4% (p/p) de conteúdo lipídico. Smiderle e colaboradores (2012) encontraram concentrações bem menores de lipídeos na biomassa de *Pleurotus pulmonarius* cultivados em fermentação submersa usando diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, galactose e arabinose). Arabinose forneceu maior conteúdo lipídico (1,6%) e glicose forneceu o menor (0,8% p/p). Campioni (2010) avaliou o conteúdo de extrato etéreo de *Botryosphaeria rhodina* cultivado em sacarose e nitrato de amônio, e obteve 5,2% (p/p).

O conteúdo de polissacarídeos solúveis em álcali foi mensurado após extração com solução de NaOH 10% (p/p). A fração de carboidratos variou entre 15,9 e 32,3% (p/p) para as diferentes fontes de carbono testadas. Para obtenção de carboidratos no extrato alcalino, as fontes de carbono que se destacaram foram os cultivados em glicose (0,32 g carboidrato/g micélio) e sacarose (0,29 g carboidrato/g micélio). Esses rendimentos são superiores aos obtidos no cultivo em frascos agitados, no meio otimizado, em 72h (0,17 g carboidrato/g micélio, no meio 5, em 72h), tornando a biomassa de *L. theobromae* mais uma fonte de carboidratos, e também um potencial substrato em meio de cultivo complexo, alternativa já explorada pelo nosso grupo de pesquisa (BUENO, 2013).

A fração de carboidratos solúveis mais abundante foi obtida quando o fungo foi cultivado em frutose ou melão. Quando *L. theobromae* foi cultivado usando glicose, a fração insolúvel encontrava-se presente em maior rendimento.

A fração de carboidratos da biomassa fúngica também foi avaliada também quanto à sua composição de monossacarídeos (Tabela 21).

A composição de monossacarídeos variou em função do nutriente utilizado no meio de cultivo. Para todas as fontes de carbono, a fração insolúvel foi composta principalmente de glicose (média de 94%). Já as frações solúveis, foram predominantemente compostas por glicose (entre 40 e 80%) e galactose (entre 17 e 30%). Manose foi o terceiro monossacarídeo mais abundante nas frações solúveis, presente nos micélios de frutose e melão (9% p/p).

Para as frações solúveis, o grau de pureza da sacarose não influenciou nos tipos de monossacarídeos presentes. A fração solúvel obtida de melão apresentou composição mais heterogênea, contendo 40% de glicose, 30% de galactose, 15% de arabinose, 9% de manose, 5% de xilose e traços de ramnose e fucose.

Tabela 21: Porcentagem de Monossacarídeos presentes nas frações Solúvel em água fria (S) e insolúvel em água fria (P) da Biomassa Seca de *L. theobromae* cultivada em diferentes Fontes de Carbono.

fração	Fonte de Carbono	Monossacarídeos (%)						
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
SOLÚVEL	Glicose	1,06	tr	tr	1,32	2,54	19,20	75,88
	Frutose	1,40	tr	1,24	3,20	9,42	18,98	65,76
	Sacarose	-	tr	tr	tr	3,69	20,84	75,47
	Sacarose Comercial	-	tr	tr	tr	2,05	16,83	81,11
	Melão	1,09	tr	14,63	5,26	8,52	30,02	40,47
INSOLÚVEL	Glicose	-	2,61	-	4,00	-	-	93,39
	Frutose	-	tr	tr	1,57	1,05	1,48	95,90
	Sacarose	1,06	tr	tr	1,94	tr	1,87	95,13
	Sacarose Comercial	-	1,82	tr	tr	tr	tr	98,18
	Melão	-	tr	tr	7,09	1,73	1,79	89,39

Rha=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xyl=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Glu=glicose, tr=traços, (-)=monossacarídeo ausente.

Os perfis de RMN- ^{13}C das frações brutas (Figura 20, A a D) apresentam os diferentes perfis dos polissacarídeos extraídos de micélios cultivados em glicose, Frutose, Sacarose P.A. e comercial. O espectro dos polissacarídeos obtidos de melão apresentou perfil com muitos picos (dado não mostrado), sendo inconclusivo nesse nível de purificação.

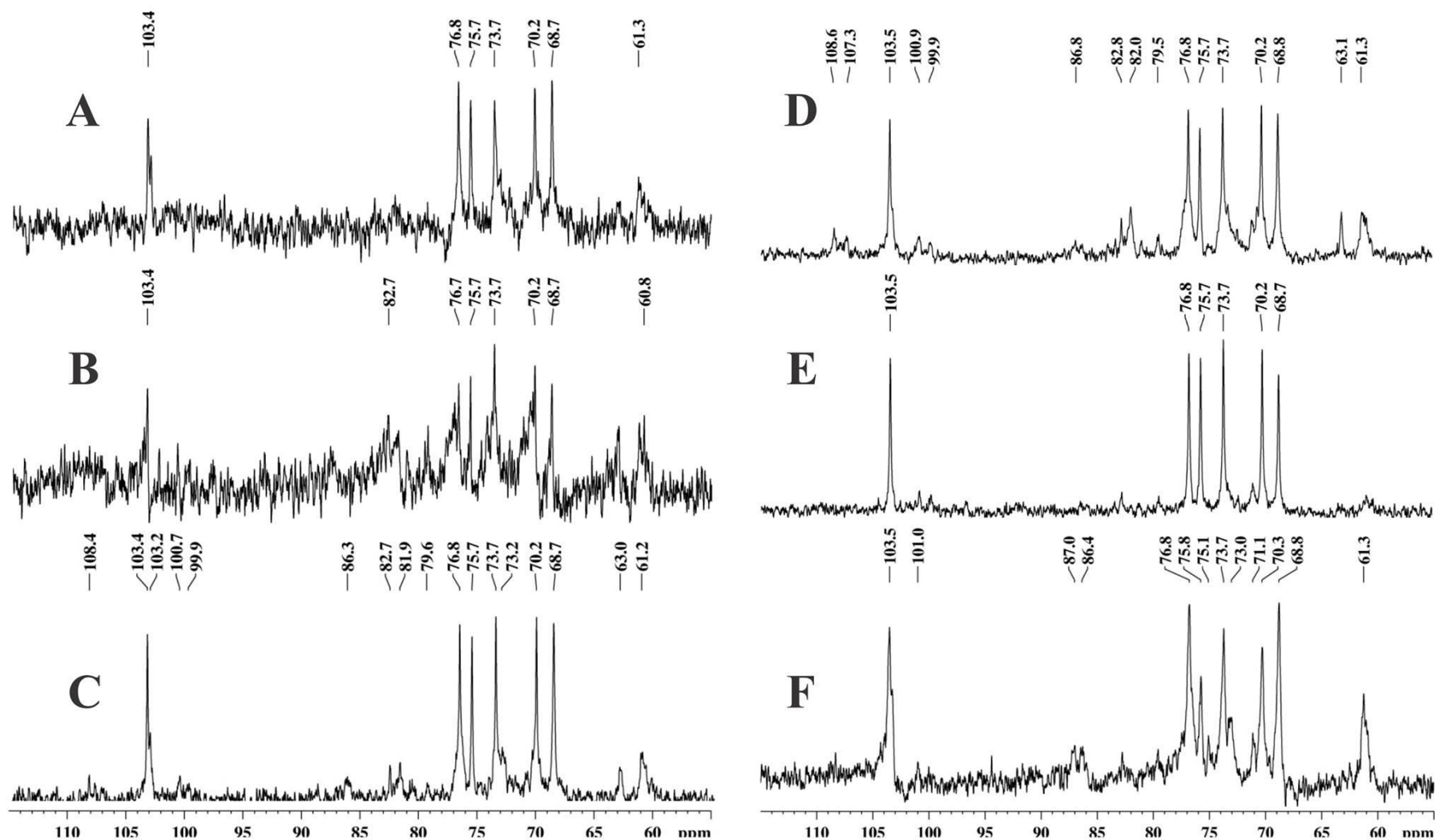


Figura 20: Espectro de ^{13}C das frações de polissacarídeos obtidos de micélio *L. theobromae* cultivado em A) Glicose; B) Frutose; C) Sacarose P.A. e D) Sacarose Comercial. E) Fração precipitada dos polissacarídeos de micélio cultivado em Sacarose P. A. (SACAROSE P) e F) Fração precipitada dos polissacarídeos de micélio cultivado em Sacarose Comercial (COMERCIAL P) Solvente DMSO-d_6 a 50°C . Deslocamentos expressos em ppm.

Os espectros dos polissacarídeos vindos de glicose, sacarose P.A. e sacarose comercial (Figura 20, A, C e D) apresentaram seis sinais com maior intensidade, em δ 103,4 (C1); 76,8 (C3); 75,7 (C5); 73,7 (C2); 70,2 (C4) e 68,7 (C6), os quais indicam a presença de uma glucana linear com ligação do tipo β -(1 \rightarrow 6) na biomassa de *L. theobromae*.

Sinais de menor intensidade foram observados, principalmente nos espectros das amostras de polissacarídeos de sacarose e podem estar relacionados à uma β -galactofuranose terminal ligada em C2. Os sinais em 107,0 (C1); 86,8 (C2); 82,0 (C4) e 63,1 ppm (C6) são característicos desse monossacarídeo (VINOGRADOV et al., 2013). Os sinais de C3 (75,2) e C5 (70,0) da galactofuranose estariam superpostos pelos sinais de C3 e C4 da β -glucopiranosose da β -glucana-(1 \rightarrow 6).

Após o fracionamento dessas amostras por congelamento e degelo, os polissacarídeos de cada substrato foram divididos em amostras solúveis (S) e insolúveis (P) em água fria.

O perfil de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos da fração Sacarose P.A. precipitada (SAC P) (Figura 20, E) apresentou seis sinais em 103,5 (C1); 76,8 (C3); 75,7 (C5); 73,7 (C2); 70,2 (C4) e 68,7 (C6), característicos de uma glucana linear do tipo β , com ligações (1 \rightarrow 6) (SMIDERLE et al., 2011). O fracionamento por congelamento e degelo foi eficiente, originando perfil de uma β -(1 \rightarrow 6)-glucana de maior resolução, confirmada desaparecimento dos sinais em δ 108,4, 100,7 e dos sinais próximos a 82,0 e 62,0, que poderiam estar relacionados à β -galactofuranose (TOSIN, 2008; VINOGRADOV et al., 2013).

O perfil de RMN- C^{13} da fração Sacarose Comercial precipitada (COMERCIAL P) (Figura 20, F) também apresentou os sinais de uma cadeia linear de β -glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 6): δ 103,5 (C1); 76,8 (C3); 75,8 (C5); 73,7 (C2); 70,3 (C4) e 68,8 (C6). Além destes sinais, pode-se observar sinais em δ 87,0 e 86,4, que podem ser atribuídos ao C-3 substituído das unidades de β -glicose, bem como sinal em δ 61,3 que pode ser atribuído ao C-6 livre destas unidades, indicando desta maneira, a presença de uma β -glucana-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6) (SMIDERLE et al., 2006).

Na parede celular do fungo *L. theobromae* MMPI, usado neste trabalho, estão presentes glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 6), na extraída com álcali e insolúvel em água fria.

Ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 6) representam 10% da parede celular de leveduras (LATGÉ; CALDERONE, 2005), como em *Saccharomyces cerevisiae* (KOLLÁR et al., 1995; NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998) e também está presente em *Candida albicans* (FONTAINE et al., 2000). Essas estruturas formam uma espécie de cola flexível, conectando β -(1 \rightarrow 3)-glucanas e quitina às manoproteínas da parede celular (KOLLÁR et al., 1995; LATGÉ, 2010).

Glucanas lineares com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) já foram encontradas em diferentes organismos. Smiderle e colaboradores (2011) obtiveram esse tipo de glucana pela extração aquosa à quente do micélio do basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Bhanja e colaboradores (2012) encontraram estrutura similar no corpo de frutificação de *Termitomyces robustus*, obtida por extração à quente. Já na parede celular de ascomicetos, acreditava-se que os polissacarídeos se resumiam à quitina, glucanas tipo β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6), α -glucanas-(1 \rightarrow 3) ou galactomananas, sendo ausente estruturas lineares do tipo β -glucanas-(1 \rightarrow 6) (BEAUVAIS et al., 2005; FONTAINE et al., 2000; GRÜN et al., 2005; SUGAWARA et al., 2004). Em 2009, Bi e colaboradores obtiveram β -glucanas-(1 \rightarrow 6) por extração aquosa à quente a partir do micélio do fungo filamentoso *Bulgaria inquinans*.

5.2 Estudo da produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* em bioreator

O meio otimizado no cultivo em agitador orbital, contendo 56,6 g/L de sacarose comercial e 2,03 g/L de nitrato de amônio, foi utilizado no estudo em bioreator. Dois diferentes níveis de aeração (0,8 e 1,5 vvm) foram testados. O cultivo foi conduzido até que a concentração de oxigênio fosse menor ou igual a 20% de saturação.

5.2.1 Influência da aeração na morfologia celular de *L. theobromae* cultivado em bioreator

Os experimentos realizados em bioreator foram analisados quanto à morfologia do micélio, tanto visualmente quanto no microscópio ótico. Em todos os cultivos, o fungo *L. theobromae* cresceu com morfologia de filamentos dispersos. Em nenhuma das replicatas foram obtidos crescimento em *pellet*. Imagens de microscopia dos tratamentos foram capturadas e posteriormente tratadas pelo programa ImageJ (Figuras 21, A e B).

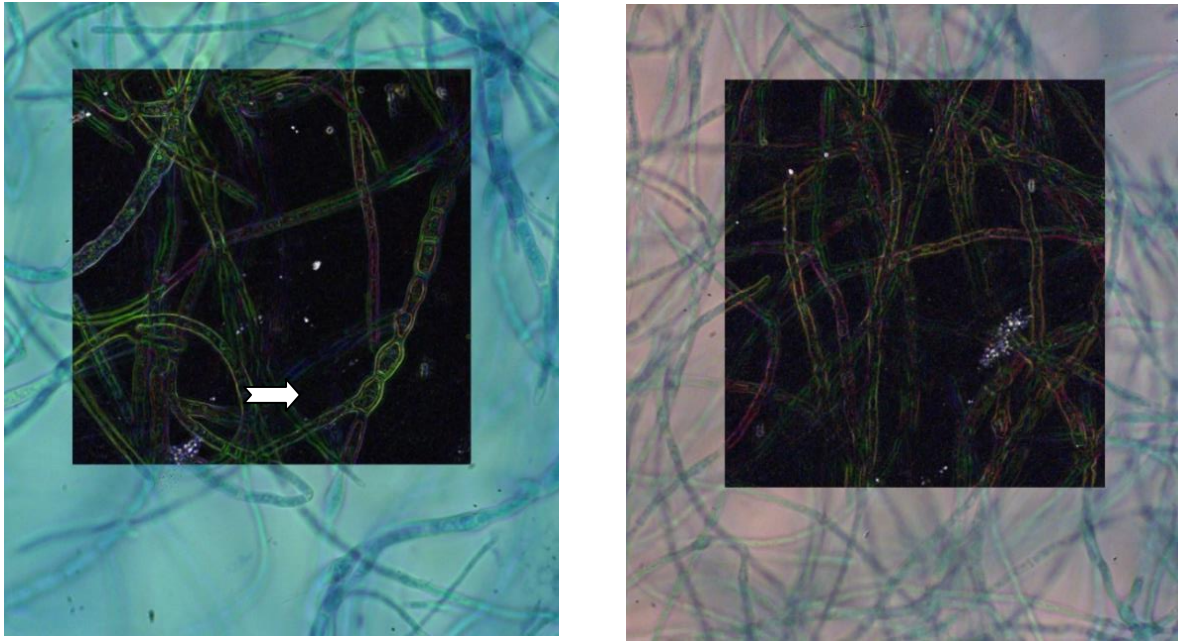


Figura 21: Fotomicrografia de micélios coletados no final do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* a 0,8vvm (A) e 1,5 vvm (B), ilustrando morfologia das células cultivadas em bioreator a 300 rpm. Imagens obtidas em microscópio ótico, em aumento de 400× com adição de solução alcoólica de azul de metileno 0,5%. Área destacada foi tratada com o algoritmo “find edges” do programa Image J (versão 1.47v). Seta branca em A indica célula inflada no filamento.

O fungo *L. theobromae* apresentou células de maior diâmetro e maior frequência de células infladas (seta branca) ao longo das hifas quando cultivado em menor aeração. Além disso, as imagens tratadas evidenciam que a espessura da parede e o volume das células cultivadas em aeração mais baixa foram maiores.

5.2.2 Influência da aeração na produção de EPS, nos parâmetros fermentativos, no consumo de O₂ e na síntese de glucanas

Os cultivos em aerações distintas proporcionaram ao fungo diferentes ambientes para crescimento. O perfil de síntese de biomassa e EPS, do consumo de substrato, concentração de O₂ e pH ao longo de 72h de cultivo a 300 rpm a 0,8 vvm ou 1,5 vvm são apresentados na Figuras 22.

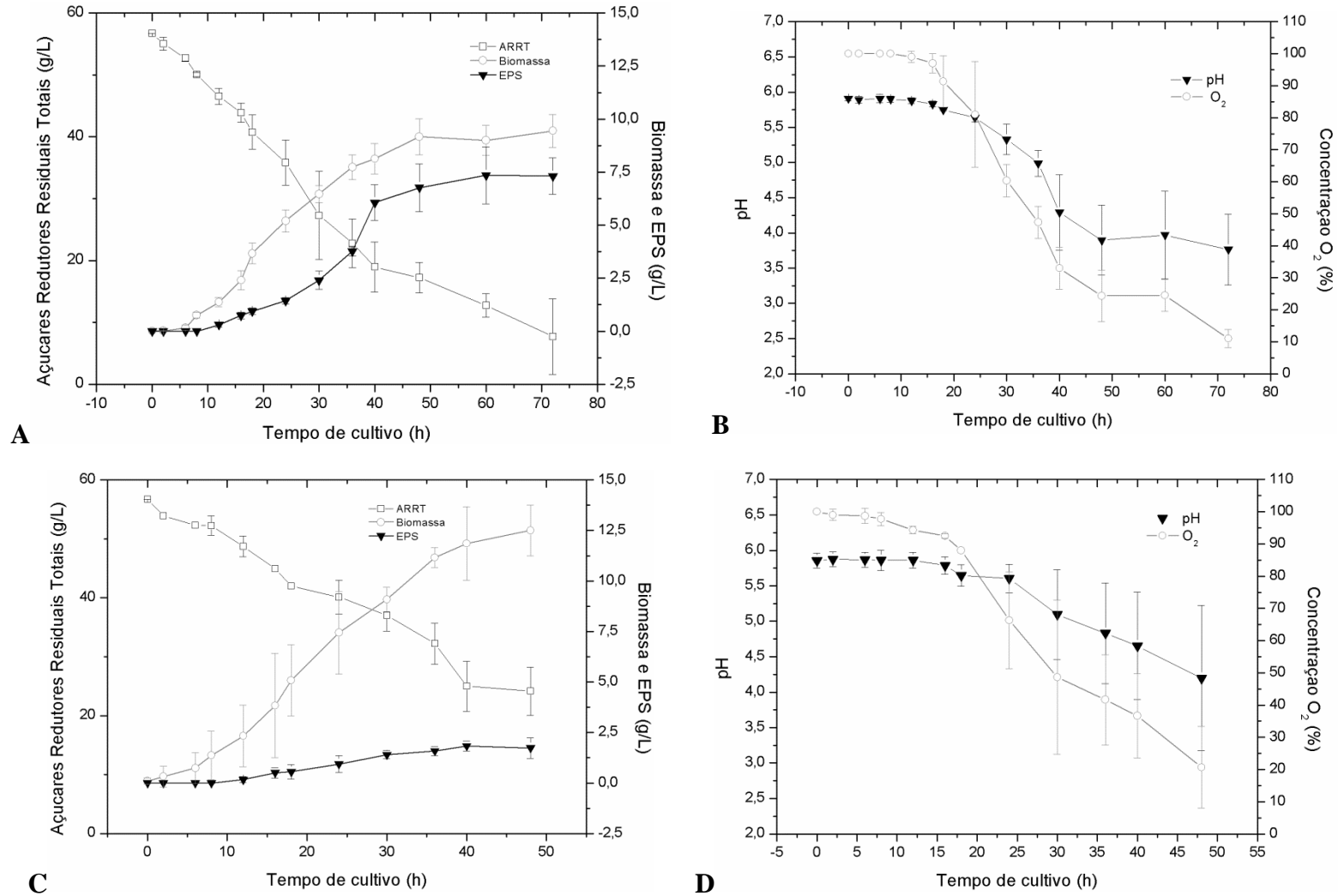


Figura 22: Efeito da aeração na cinética de fermentação, pH e concentração de oxigênio ao longo do cultivo de *L. theobromae* em bioreator. Meio contendo 56,6 g/L de sacarose comercial. Aeração de 0,8 (A e B) ou 1,5 vvm (C e D).

Nos cultivos realizados com 0,8 vvm (Figura 22, A e B), verificou-se que a fase log de crescimento celular ocorreu entre 6 e 48h, seguido de fase estacionária até 72h, quando a concentração de oxigênio se encontrava abaixo de 20% ($11 \pm 3\%$, Figura 22). A maior concentração de biomassa foi de 9,45 g/L, em 72h. P_x foi igual a 0,22 g/Lh entre 24 e 36h e a máxima velocidade de síntese de biomassa foi de 0,17 g/Lh. A concentração de EPS alcançou sua máxima concentração em 60h (7,35 g/L) e apresentou velocidade instantânea máxima de síntese entre 8 e 40 horas (0,13 g/Lh). A partir desse momento a concentração de produto permaneceu em torno de 6,5 g/L até o fim do cultivo. Não houve queda da concentração de produto, indicando que até o fim dos cultivos o fungo ainda era capaz de alcançar fonte de carbono e utilizá-la para suas necessidades energéticas. O cultivo em 0,8 vvm proporcionou queda constante de substrato até uma média de 8 g/L de ARRT, definindo um consumo de 90% do substrato fornecido inicialmente em 72h. A velocidade máxima de consumo de substrato ($r_{S \text{ MÁX}}$) foi de 0,97 g/L.h, calculada pela linearização dos pontos de máxima queda de concentração de substrato em função do tempo. A máxima velocidade específica de consumo de substrato ($\mu_{S \text{ MÁX}}$) foi de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e a velocidade de consumo de substrato média para cada tratamento foi de 0,91 (0,8 vvm) e 0,66 g/Lh (1,5 vvm).

Os resultados obtidos em cultivos realizados a 1,5 vvm estão apresentados na Figura 22 (C e D). Apesar da aeração mais alta, a concentração de oxigênio caiu com maior velocidade do que nos cultivos realizados a 0,8 vvm, alcançando a concentração crítica de oxigênio (20%) já em 48h de cultivo. Para evitar a condição de anaerobiose, o cultivo foi interrompido nesse período. O crescimento celular foi praticamente linear entre 6 e 40h, caracterizando fase log durante todo o cultivo. A concentração de biomassa seca foi mais alta nessa aeração, alcançando máximo de 12,50 g/L em 48h, superior portanto ao experimento com 0,8 vvm (9,5 g/L). Essa concentração de biomassa só não foi superior aos ensaios em frascos agitados. A produtividade de biomassa seca também sobressaiu nesse tratamento (0,31 g/Lh).

Os índices de k_{La} , produtividade, velocidade instantânea e específica de crescimento máximos foram calculados e são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Paralelo entre os parâmetros fermentativos dos cultivos em bioreator e em agitador orbital usando meio otimizado.

Parâmetros fermentativos	Bioreator				Agitador orbital	
	0,8 vvm	Tempo	1,5 vvm	tempo	tempo	
Biomassa máx (g/L)	9,45	72 h	12,50	48h	19,1	96 h
EPS máx (g/L)	7,35	60 h	1,83	40h	2,2	72 h
SEPS (g/L)	1,83	60 h	0,66	48 h	0,6	72 h
PEPS (g/L)	5,52	60 h	1,06	48 h	1,4	72 h
Razão SEPS:PEPS (g/g)	0,33:1	72 h	0,72:1	48 h	0,39:1	72 h
% ART consumido máx	88%	72 h	57%	48 h	91%	96 h
$Y_{X/S}$ máx (g/g)	0,25	24 h	0,47	30 h	0,37	96 h
$Y_{P/S}$ máx (g/g)	0,17	48 e 60h	0,07	30 e 36h	0,05	72 h
$Y_{X/P}$ mín (g/g)	1,23	72 h	5,13	24 h	5,84	72 h
P_X máx (g/Lh)	0,22	24 e 36h	0,31	36 h	0,20	96 h
P_P máx (g/Lh)	0,15	40 h	0,05	30 e 40h	0,03	72 h
r_X máx (g/Lh)	0,17	-	0,32	-	-	-
r_P máx (g/Lh)	0,13	-	0,06	-	-	-
r_S máx (g/Lh)	- 0,97	-	- 0,70	-	-	-
μ_X máx (h^{-1})	0,17	-	0,29	-	-	-
μ_P máx (h^{-1})	0,13	-	0,11	-	-	-
μ_S máx (h^{-1})	- 0,03	-	- 0,02	-	-	-
k_{La} (s^{-1})	13,2±3,9	-	61,3±2,0	-	-	-
q_{O_2} (% min^{-1} g biomassa L^{-1})	1,08±0,47	-	0,75±0,37	-	-	-

sendo máx=máximo; mín=mínimo; EPS=exopolissacarídeo; $Y_{X/S}$ = conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ conversão de substrato em produto; $Y_{X/P}$ =relação biomassa e produto; índice X=biomassa, índice P=produto ou índice S=substrato; P=produtividade; r=velocidade instantânea; μ = velocidade específica; k_{La} = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio; q_{O_2} = taxa de consumo de oxigênio.

Embora tenha ocorrido maior crescimento do fungo, a maior aeração não proporcionou aumento na produção de EPS, alcançando o máximo de 1,83 g/L em 40h de cultivo. O fator de conversão $Y_{P/S}$ também não foi alto (0,07 g/g), próximo ao fator de conversão observado no cultivo de frascos agitados (0,05 g/g). A produtividade P_P nessa aeração também foi menor (0,05 g/Lh), bem próximo ao observado em frasco agitado (0,03 g/Lh). As velocidades específica e instantânea de síntese de EPS (r_P e μ_P) foram inferiores àquelas obtidas na aeração de 0,8 vvm (0,06 g/Lh e 0,11 h^{-1}). A queda de substrato apresentou

velocidade específica ($0,02 \text{ h}^{-1}$) e instantânea ($0,70 \text{ g/Lh}$) menores do que nos cultivos com $0,8 \text{ vvm}$, o que se refletiu em alta concentração residual de substrato (43% dos ART iniciais).

A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que nos cultivos com $1,5 \text{ vvm}$ a síntese de biomassa foi favorecida, pois os índices concentração de biomassa, $Y_{X/S}$, P_X ; r_X ; μ_X foram mais altos nessa condição. Nos cultivos a $0,8 \text{ vvm}$, ao contrário, observou-se menor crescimento, porém maior produção de EPS, confirmado pelos parâmetros fermentativos de síntese de produto (Tabela 22), dentre eles as velocidades instantâneas e específicas. O excelente desempenho para síntese de EPS em menor aeração se confirma na relação $Y_{P/S}$ obtida com $0,8 \text{ vvm}$, com conversão de 17% do substrato consumido em EPS.

A razão SEPS:PEPS no bioreator no tempo final de cultivo indica que a concentração de fração SEPS foi maior no cultivo com $0,8 \text{ vvm}$ de aeração, embora sua porcentagem seja de apenas 25% do total de EPS produzido. O rendimento SEPS:PEPS a $0,8 \text{ vvm}$ foi similar ao observado em agitador orbital no meio otimizado. Assim, podemos observar que cada condição e cultivo favorece a síntese de diferentes polissacarídeos ou o crescimento celular.

É interessante, também, observar os diferentes resultados em frasco agitado e bioreator. Embora tenha sido usado o mesmo meio de cultivo, supunha-se que os parâmetros cinéticos e concentração de produto e biomassa certamente seriam diferentes, o que foi confirmado pelos resultados obtidos. Para homogeneizar esse meio com viscosidade aumentada é necessária maior velocidade de agitação. No entanto, em cultivos em agitador a velocidade é mantida constante, fazendo com que a distribuição de oxigênio fique mais prejudicada enquanto ocorre aumento da concentração de biomassa e de produto. Além disso, o crescimento celular de fungos filamentosos consiste em uma sequência complexa de processos de diferenciação de conídio à hifas, distribuindo seus filamentos em várias direções, tornando o caldo fermentado mais difícil de misturar, tornando o líquido viscoso e muitas vezes com características de um sólido (EL-ENSHASY, 2007; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; GRIMM et al., 2005; ROUKAS; MANTZOURIDOU, 2001; SINHA et al., 2001). Assim, podemos relacionar as diferentes respostas em agitador e bioreator à distinta distribuição de oxigênio ao longo do cultivo frente às mudanças físicas no caldo fermentativo.

A concentração de O_2 também influencia a síntese de EPS. Os níveis de oxigênio caíram de 100% para 20% entre 2 e 3 dias. A manutenção da porcentagem de saturação de oxigênio em níveis mais altos favoreceram a síntese de EPS, enquanto altos volumes de aeração favoreceram o crescimento celular. Esses resultados estão de acordo com os obtidos com outros micro-organismos visando síntese de EPS (CHO et al., 2006; GIBBS; SEVIOUR, 1996; MARTIN; BAILEY, 1985).

Neste trabalho, foi avaliado através do método dinâmico o k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio), parâmetro importante para verificar a distribuição de oxigênio no meio de cultivo estudado e fornecer dados para ampliação de escala desse bioprocesso. No momento 24h de cultivo, procedeu-se corte e retomada de aeração, que gerou dados para cálculo do k_La nas condições de cultivo - 0,8 vvm ou 1,5 vvm - mantendo sempre a agitação constante. A diferença no coeficiente volumétrico entre as aerações testadas foi de $13,2 \text{ h}^{-1}$ utilizando 0,8 vvm e $61,3 \text{ h}^{-1}$ para 1,5 vvm (Tabela 22). Nota-se que a transferência de oxigênio foi maior quando a aeração foi de 1,5 vvm. Embora os cultivos tenham sido conduzidos com diferentes aerações, a demanda de O_2 por peso de biomassa foi similar (Tabela 22). Isso demonstra que a demanda de oxigênio nessas duas condições são próximas, mesmo tendo diferentes velocidades de síntese celular e de produto. A demanda de oxigênio informa, de uma maneira geral, o metabolismo global das células fúngicas e, nas condições do experimento, indica que eram similares, não importando a aeração oferecida ao caldo. A diferença entre os experimentos é o direcionamento da energia metabólica. Com aeração de 0,8vvm o metabolismo favorecido foi o de síntese de EPS, enquanto na aeração de 1,5vvm o uso dessa energia foi predominantemente direcionado para novas células.

5.2.3 Avaliação reológica em regime estacionário do caldo fermentado ao longo o cultivo de *L. theobromae* em bioreator em diferentes volumes de aeração

As características físicas, especialmente reológicas, de caldos fermentativos têm sido explorada no cultivo de fungos filamentosos, mais destacadamente em bioprocessos de produção de EPS.

As amostras coletadas entre os tempos 18 e 72h (item 4.8.9) nas duas aerações testadas foram avaliadas em viscosímetro de cilindros concêntricos quanto a suas características reológicas. Alíquotas de cada coleta do bioreator foram lidas em viscosímetro de cilindros concêntricos. Para cada tempo de cultivo foram apresentadas as curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento.

As curvas de viscosidade (Figura 23, A e B) mostram comportamento tipicamente pseudoplástico, para o caldo fermentado em qualquer aeração. O decréscimo da viscosidade do fluido à medida que aumenta a taxa de cisalhamento, é uma característica de fluidos pseudoplásticos. Muitos autores observaram o mesmo comportamento em outros trabalhos com fungos filamentosos em cultivo submerso (BENCHAPATTARAPONG et al., 2005; JANSSEN et al., 1995; KRULL et al., 2013; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; RILEY et al., 2000; RODRÍGUEZ PORCEL et al., 2005; WUCHERPFENNIG et al., 2010).

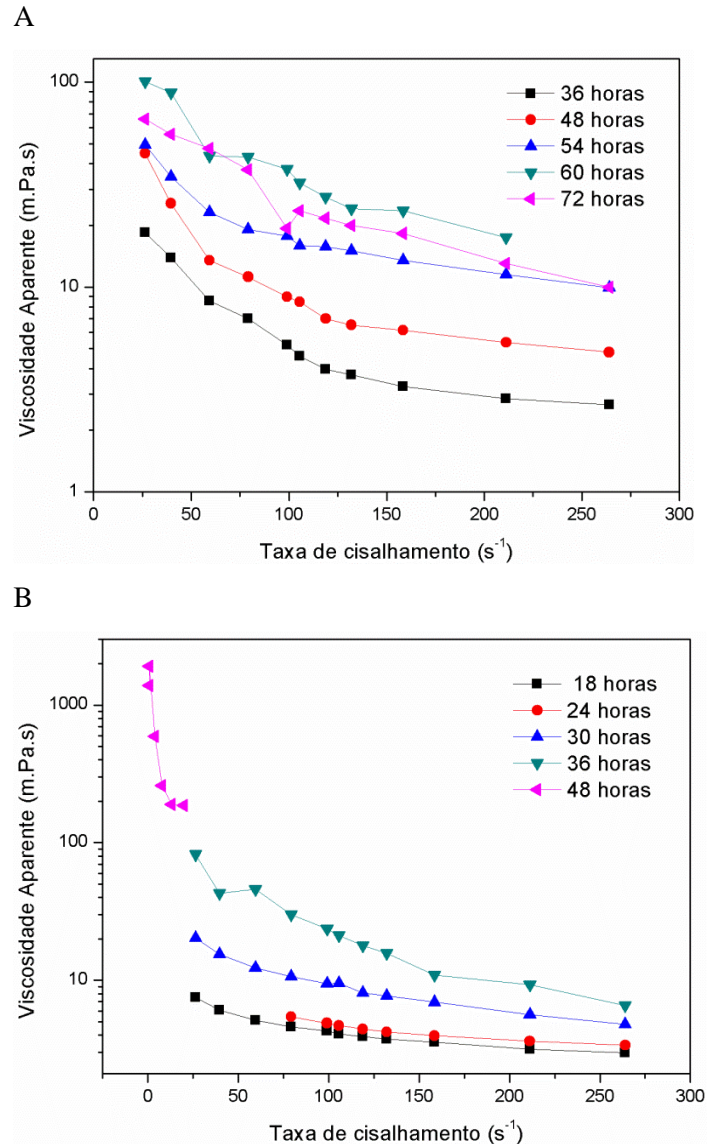


Figura 23 Influência da taxa de cisalhamento na viscosidade aparente do meio de cultivo de *L. theobromae* em bioreator a 0,8 vvm (A) ou 1,5 vvm (B).

Para o cultivo a 0,8vvm, as curvas apresentaram viscosidade aparente crescente, a medida que tempo de cultivo aumentava, para a maioria das taxas de cisalhamento aplicadas. Entre 54 e 72h a mudança na viscosidade do caldo foi menor. Nesse intervalo a concentração de biomassa e EPS estabilizaram suas concentrações (em 9 e 7 g/L, respectivamente). A viscosidade máxima de caldo observada a $26,4 \text{ s}^{-1}$ foi de 101 m.Pa.s para o caldo cultivado até 60 h. No cultivo de *L. theobromae* com 0,8vvm, a concentração de EPS aumentou de 0,5 para 6,2 g/L entre 16 e 40h (Figura 22 A). A concentração de biomassa também apresentou um grande incremento da concentração celular no mesmo período. Já no cultivo a 1,5 vvm (Figura 23, B) a viscosidade aparente do caldo foi similar em 18 e 24 horas de fermentação. A partir desse instante, a viscosidade aumentou em 30 h, sendo ainda maior nas coletas em 36 e

48 h de cultivo, quando a fermentação foi interrompido pela baixa concentração de OD. O caldo cultivado até 48 h só pôde ser lido usando sensor 31, que usa taxas mais baixas de leitura.

Curvas de fluxo foram ajustadas aos modelos matemáticos de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley (Tabela 23), pois são os modelos mais utilizados para modelagem de fluidos fermentativos, por isso foram escolhidos neste trabalho. Esses modelos diferenciam-se pela presença da tensão inicial (τ_0), que representa a tensão necessária para início do fluxo. Os ajustes que apresentaram valores negativos de tensão inicial (em 0,8 vvm: 36 e 48h; em 1,5 vvm: 30h, para caldos com células) foram ignorados, sendo nesses casos escolhido o modelo de Ostwald. Nos outros casos, a escolha do modelo mais adequado se baseia na preferência por altos valores de R^2 e baixos valores de χ^2 e SQR. Finalmente, quando os dois modelos foram bem ajustados, escolheu-se o modelo mais simples (modelo de Ostwald).

Para todos os ajustes válidos (ou seja, exceto aqueles que apresentaram dados negativos nos ajustes) os índices de comportamento para um mesmo fluido foram sempre mais baixos para o modelo de Ostwald. Também houve diferença entre os coeficientes de determinação, sendo iguais ou maiores no modelo de Herschel-Bulkley.

Para os fluidos com células, as características reológicas foram mais bem descritas por Ostwald-de-Waele no início do cultivo. Com maior desenvolvimento celular e aumento da rede de células no cultivo, o modelo de Herschel-Bulkley foi sendo aplicado aos dados experimentais. No cultivo a 1,5 vvm, o fluido coletado em 48h demonstrou n_{HB} igual a 2,21, que não caracteriza um fluido pseudoplástico. Como os modelos escolhidos se aplicam apenas a fluidos não newtonianos, o modelo de Ostwald foi escolhido para descrever essa amostra.

Para os fluidos sem células, o modelo de Herschel-Bulkley foi quase sempre o melhor ajustado aos dados. No cultivo a 0,8 vvm, os valores de n foram superiores a 0,88, indicando fluidos de baixa pseudoplasticidade. Para o cultivo a 1,5 vvm, a pseudoplasticidade do único fluido que apresentou curva de fluxo foi de 0,57, sendo a amostra de fluido sem células mais pseudoplástica observada.

De uma maneira geral, o índice de comportamento decresceu com o tempo de fermentação, indicando aumento de pseudoplasticidade e maior caráter não-Newtoniano. A queda nesse índice, no entanto, não aconteceu até o fim do cultivo, sendo menor quando o máximo de células era alcançado. O comportamento pseudoplástico em fluidos de cultivo é característico de fungos filamentosos (BENCHAPATTARAPONG et al., 2005; CHO et al., 2006; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; WUCHERPFENNIG; LAKOWITZ; KRULL, 2013).

Tabela 23: Ajuste matemático da curva de fluxo obtida em viscosímetro (25°C, sensor 18) aos modelos de escoamento de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley das amostras de caldo fermentado por *L. theobromae* em bioreator na aeração de 0,8 ou 1,5 vvm. . Para cada tempo de cultivo foi escolhido o modelo matemático que melhor descreveu dados empíricos, marcado em negrito.

		Caldo fermentado COM células						Caldo fermentado SEM células															
		Ajuste Ostwald-de-Waele			Ajuste Herschel-Bulkley			Ajuste de Ostwald-de-Waele			Ajuste Herschel-Bulkley												
		K_{OW}	n_{OW}	χ^2	SQR	R^2	K_{HB}	n_{HB}	τ_0	χ^2	SQR	R^2	K_{OW}	n_{OW}	χ^2	SQR	R^2	K_{HB}	n_{HB}	τ_0	χ^2	SQR	R^2
0,8 vvm	36h	0,22	0,20	0,004	0,06	0,88	0,97	0,06	-0,77	0,004	0,05	0,89	0,05	0,83	6.10⁻⁴	4.10⁻⁵	0,99	0,002	0,95	0,03	10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	0,99
	48h	0,62	0,10	0,02	0,33	0,61	0,57	0,19	-0,02	0,001	0,003	0,99	0,02	0,70	3.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁴	0,99	0,009	0,83	0,10	2.10⁻⁵	10⁻⁴	0,99
	54h	0,27	0,41	0,007	0,05	0,97	0,04	0,68	0,74	0,005	0,04	0,98	0,06	0,60	3.10 ⁻⁴	0,003	0,99	0,03	0,72	0,18	3.10⁻⁵	2.10⁻⁴	0,99
	60h	0,833	0,24	0,004	0,006	0,99	0,23	0,40	1,01	0,002	0,004	0,99	0,02	0,64	5.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁴	0,99	0,005	0,88	0,16	3.10⁻⁵	10⁻⁴	0,99
	72h	1,02	0,18	0,08	0,38	0,58	sem ajuste						0,04	0,57	0,003	0,001	0,99	sem ajuste					
1,5 vvm	18h	0,03	0,57	2.10 ⁻⁴	0,002	0,99	0,02	0,67	0,06	3.10⁻⁴	0,002	0,99	Sem leitura			Sem leitura							
	24h	0,02	0,63	10⁻⁴	10⁻³	0,99	0,001	1,04	0,25	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	0,99	Sem leitura			Sem leitura							
	30h	0,16	0,34	5.10⁻⁴	0,005	0,99	0,86	0,18	-1,01	2.10 ⁻⁴	0,002	0,99	Sem leitura			Sem leitura							
	36h	8,35	-0,28	0,004	0,03	0,96	0,07	0,66	0,26	0,008	0,11	0,99	Sem leitura			Sem leitura							
	48h	1,45	0,26	0,23	0,67	0,74	0,002	2,21	1,86	0,16	0,32	0,93	0,30	0,44	0,02	0,27	0,98	0,13	0,57	0,37	0,007	0,12	0,99

n_{OW} e n_{HB} indicam índices de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley, respectivamente. K = índice consistência; n = índice de comportamento; τ_0 =tensão inicial de Herschel Bulkley ; χ^2 =qui-quadrado; SQR= soma dos quadrados dos resíduos; R^2 = coeficiente de determinação

A grande diferença da pseudoplasticidade e da viscosidade aparente entre os fluidos com e sem células pode estar relacionada tanto ao conteúdo de micélios quanto à concentração de EPS presentes no cultivo. O crescimento celular intenso pode ser um empecilho nas operações unitárias de separação em bioprocessos. Grande crescimento celular pode impedir que potência do agitador seja integralmente transferida à coluna de líquido, aumentando, assim, o tempo de mistura e diminuindo a difusão de oxigênio no caldo fermentativo, podendo ocasionar grande impacto na produtividade do processo.

O estudo da Reologia de caldo fermentativo se mostra fundamental no cultivo de fungos filamentosos, sendo de grande importância avaliar as mudanças físicas ao longo de todo o processo.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, as estruturas dos EPS produzidos por *L. theobromae* foram descritas como três diferentes glucanas. Uma delas, chamada PEPS, se trata de uma β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucana insolúvel em água fria. As outras duas, SEPS 10E e SEPS 005R, foram caracterizadas como β -(1 \rightarrow 6)-glucanas de 7 e 1800 kDa, respectivamente. O polissacarídeo SEPS 005R é a maior β -(1 \rightarrow 6)-glucana obtida na literatura a partir de cultivos submersos ou de corpos de frutificação. Glucanas com essas estruturas podem ser exploradas como agentes imunomoduladores.

O extrato alcalino das biomassas de *L. theobromae* obtidas em cultivo submerso apresentaram principalmente glicose em sua composição, para qualquer substrato usado como fonte de nutrientes (sacarose pura, sacarose comercial, glicose, frutose ou melaço de cana de açúcar). Micélios cultivados em sacarose pura ou comercial apresentaram polissacarídeos do tipo β -(1 \rightarrow 6)-glucanas. A biomassa pode ser uma alternativa para extração desse polissacarídeo, ou pode ser explorada como fonte de nutrientes, devido seu conteúdo de monossacarídeos e compostos apolares.

Sacarose Comercial e nitrato de amônio favorecem a síntese de EPS por *L. theobromae*. Em bioreator, menor aeração favorece a produtividade e as velocidades específica e a instantânea de síntese de produto, enquanto que aerações maiores favoreceram o crescimento celular. Os parâmetros fermentativos e o k_{La} apresentados neste trabalho podem fundamentar os estudos de ampliação de escala para esse e outros bioprocessos usando fungos filamentosos.

A avaliação reológica mostrou que caldos fermentativos são não-Newtonianos e pseudoplásticos. Os caldos com células são mais viscosos e pseudoplásticos que os caldos sem células. Os fluidos contendo biomassa foram mais estáveis à variação de frequência e de ciclo de temperatura que os caldos centrifugados, mantendo suas propriedades viscoelásticas. A descrição reológica desse fluido fermentativo pode colaborar com pesquisas de dimensionamento de linhas separação e purificação no bioprocessos de síntese de glucanas pelo fungo *L. theobromae* em grande escala e para outros bioprocessos envolvendo fungos filamentosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AKHER, M., HAMILTON, J.K., MONTGOMERY, R., SMITH, F., 1952. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **Journal of American Chemical Society**, v.74, p. 4970–4971.

ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1–10, dez. 2010.

AHMAD, A. et al. Extraction and characterization of beta-D-glucan from oat for industrial utilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 304–9, 1 abr. 2010.

ALBAEK, M. O. et al. Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1828–40, ago. 2011.

AROCKIASAMY, S.; BANIK, R. M. Optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 204–10, mar. 2008.

BADINO JR, A. C. **Reologia, consumo de potência e transferência de oxigênio em cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade de São Paulo - USP, São Paulo. 1997.

BADINO, A C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 2, p. 111–119, 2001.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 216–228, out. 2006.

BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, jul. 2003.

BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J. Structural Chemistry of polisaccharides from fungi and lichens. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 41, p. 67–103, 1983.

BASMADJIAN, D. **The Art of Modeling in Science and Engineering**. [s.l.] Chapman & Hall/CRC, 1999.

BEAUVAIS, A. et al. Two α(1-3) Glucan Synthases with Different Functions in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1531–1538, 2005.

BENCHAPATTARAPONG, N. et al. Rheology and hydrodynamic properties of Tolypocladium inflatum fermentation broth and its simulation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 27, n. 4, p. 239–47, jul. 2005.

BERNARD, M.; LATGÉ, J. P. Aspergillus fumigatus cell wall: composition and biosynthesis. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39 Suppl 1, p. 9–17, jan. 2001.

BHANJA, S. K. et al. Isolation and characterization of the immunostimulating β -glucans of an edible mushroom Termitomyces robustus var. **Carbohydrate research**, v. 357, p. 83–9, 1 ago. 2012.

BHANJA, S. K. et al. Structural studies of an immunoenhancing glucan of an ectomycorrhizal fungus Ramaria botrytis. **Carbohydrate research**, v. 374, p. 59–66, 7 jun. 2013.

BHARGAVA, S. et al. Effect of cycle time on fungal morphology, broth rheology, and recombinant enzyme productivity during pulsed addition of limiting carbon source. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 524–9, 5 mar. 2005.

BHARGAVA, S.; WENGER, K. S.; MARTEN, M. R. Pulsed feeding during fed-batch Aspergillus oryzae fermentation leads to improved oxygen mass transfer. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 3, p. 1091–4, 2003.

BI, H. et al. A novel water-soluble beta-(1 \rightarrow 6)-D-glucan isolated from the fruit bodies of Bulgaria inquinans (Fries). **Carbohydrate research**, v. 344, n. 10, p. 1254–8, 6 jul. 2009.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à química dos alimentos**, São Paulo, Varela, 2003.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 28, n. 8, p. 799–808, ago. 2006.

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

BRANDI, J. Chemical Modification of Botryosphaeran: Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Water-Soluble Sulfonated (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1036–1042, 28 out. 2011.

BUCHALA, A. J.; LEISOLA, M. Structure of the β -D-glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. *Carbohydr. Res.*, v. 165, p.146-149, 1987.

BUENO, Y. C. **Biomassa fúngica como nutriente para produção de exopolissacarídeo por Lasiodiplodia theobromae**. Assis, 2013. 23p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia). Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP, 2013.

BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92–100, mar. 2013.

CAMPBELL, B. S.; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation? **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 104–112, jul. 2003.

CAMPIONI, T. S. **Estudo de características bioquímicas e físico-químicas do exopolissacarídeo e da biomassa de *Lasiodiplodia theobromae***. Assis, 2010. 30p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Biotecnológica). Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP, 2010.

CARBONERO, E. R. et al. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 681–6, nov. 2002.

CARBONERO, E. R. et al. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 13–18, jan. 2006a.

CARBONERO, E. R. et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252–257, out. 2006b.

CHAPOT-CHARTIER, M.-P. et al. Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10464–71, 2 abr. 2010.

CHEN, J.; RAYMOND, K. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. **Vascular health and risk management**, v. 4, n. 6, p. 1265–72, jan. 2008.

CHEN, J.; SEVIOUR, R.; RAMSDALE, M. Medicinal importance of fungal beta-(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological research**, v. 111, n. Pt 6, p. 635–52, jun. 2007.

CHEN, L. et al. Cell wall structure of mushroom sclerotium (*Pleurotus tuber regium*): Part 1. Fractionation and characterization of soluble cell wall polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 189–195, maio 2014.

CHHABRA, R. P.; RICHARDSON, J. F. **Non-Newtonian Flow in the Process Industries: Fundamentals and Engineering**. [s.l: s.n.]. p. 436

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U. J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 2, p. 143–153, mar. 2002.

CHO, E. J. et al. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 1, p. 129–40, 15 dez. 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209–217, 1984.

CLEARY, J. A.; KELLY, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, n. May 1999, p. 395–403, 1999.

CLEVAUD, C.; AIMANIANDA, V.; LATGE, J. P. Organization of Fungal, Oomycete and Lichen (1,3)- β -Glucans. In: **Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1 \rightarrow 3)- β -Glucans and Related Polysaccharides**. [s.l: s.n.]. p. 387–424.

CONTRERAS, A.; GARCIA, F.; MOLINA, E.; MERCHUK, J. C., Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor, *Enzyme Microb. Technol.* 25, 820-830, 1999

CORDEIRO, L. M. C.; REINHARDT, V. D. F.; IACOMINI, M. Glucomannan and branched (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) β -glucan from the aposymbiotically grown *Physcia kalbii* mycobiont. **Phytochemistry**, v. 84, p. 88–93, dez. 2012.

CORRADI da SILVA, M. L., IACOMINI, M.; JABLONK, E., GORIN, P. A. J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage. **Phytochemistry**, v.33, 3, 547-552, 1993.

COUPER, J. R. et al. Mixing and agitation. In: **Chemical Process Equipment**. [s.l: s.n.]. v. 3p. 277–328.

CROGNALE, S. et al. Enhanced production of β -glucan from *Botryosphaeria rhodina* using emulsified media or fan impellers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1-2, p. 111–120, jul. 2007.

CROGNALE, S.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. beta-Glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 23, p. 2013–5, dez. 2003.

CRUEGER, W. e CRUEGER, A. **Biotechnologia**: Manual de microbiologia industrial. Aragoza, Acribia, 1993. 413p.

CUI, F. et al. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–7, out. 2013.

CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1 \rightarrow 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.

DE OLIVEIRA, A. J. B. et al. Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1 \rightarrow 6)- β -D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 179–84, 15 abr. 2013.

DE WET, J. et al. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 1, p. 116–126, jan. 2008.

DESAI, K. M. et al. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 3, p. 266–273, out. 2008.

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, set. 2008.

DI BASTIANI, M. S. **Aplicações para o exopolissacarídeo de *Lasiodiplodia theobromae*: avaliação de atividade imunomoduladora e como veículo para fármacos.** Rio Claro, Dissertação de Mestrado em andamento (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, UNESP. Em andamento.

DI CAGNO, R. et al. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9873–9881, 2006.

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

DORAN, P. M. Material Balances. In: **Bioprocess Engineering Principles**. [s.l: s.n.]. p. 87–137.

DRONAWAT, S. N.; SVIHLA, C. K.; HANLEY, T. R. Effect of impeller geometry on gas-liquid mass transfer coefficients in filamentous suspensions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 363–73, jan. 1997.

DUTA, F. P.; FRANCA, F. P. DE; LOPES, L. M. D. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, 15 jul. 2006.

DYER J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In: GLICK, D. (ed.) **Methods of Biochemical Analysis**, New York, 1956. v. 3, p. 111-152.

EDWARDS, M. F.; BAKER, M. R. Mixing of liquids in stirred tanks. In: **Mixing in the Process Industries**. [s.l: s.n.]. p. 137–158.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–40, fev. 2012.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics , Products , and Applications. In: YANG, S.-T. (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l: s.n.]. p. 225–261.

ENGSTAD, C. S. et al. The effect of soluble beta-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 11, p. 1585–97, out. 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.

FARIÑA, J. I. et al. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* . Rheological properties , molecular weight and conformational characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 41–50, 2001.

FAZENDA, M. L. et al. Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. **Advances in Applied microbiology**, v. 63, n. 07, p. 33–103, jan. 2008.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. **Carbohydrate research**, v. 356, p. 260–4, 15 jul. 2012.

FONSECA-GARCÍA, C. et al. A novel polysaccharide secreted by pal/rim mutants of the phytopathogen fungus *Ustilago maydis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1646–1650, out. 2011.

FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27594–607, 8 set. 2000.

FRANÇOIS, N. J. et al. Investigation on the film-forming properties of lab fermenter scale produced scleroglucans from *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 45–50, ago. 2011.

FREE, S. J. **Fungal cell wall organization and biosynthesis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 81p. 33–82

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–98, ago. 2011.

FUENTE, E. B. L. A.; CHOPLIN, L.; TANGUY, P. A. MIXING WITH HELICAL RIBBON IMPELLERS : effect of highly Shear Thinning Behaviour and Impeller Geometry. **Institution of Chemical Engineers**, v. 75, n. january, p. 45–52, 1997.

GABELLE, J.-C. et al. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 75, p. 408–417, jun. 2012.

GALACTION, A.-I. et al. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, n. 1, p. 85–94, ago. 2004.

GAO, C. et al. Optimisation of exopolysaccharide production by *Gomphidius rutilus* and its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2299–2305, fev. 2012.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 7, p. 549–79, 1 nov. 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASTRO, E.; SANTOS, V. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 9, p. 680–690, 15 nov. 2000.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 153–76, 2009.

GARCIA-SOTO, M. J. et al. Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; TORRES-PACHECO, I. (Eds.). **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**. [s.l.: s.n.]. v. 661p. 17–34.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical reviews in biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, jan. 2000.

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

GIDLEY, M. J.; NISHINARI, K. Physico-Chemistry of (1,3)- β -Glucans. In: **Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1 \rightarrow 3)- β -Glucans and Related Polysaccharides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 47–118.

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, dez. 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, jun. 2006.

GONZAGA, M. L. C. et al. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 43–49, abr. 2005.

GORIN, A. J. P.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, p. 119–132, 1984.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, p. 1212–1224, 1975.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. Structural chemistry of fungal polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 23, p. 367–417, 1968.

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375–84, dez. 2005.

GRÜN, C. H. et al. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. **Glycobiology**, v. 15, n. 3, p. 245–57, mar. 2005.

GURA, E.; RAU, U. Comparison of agitators for the production of branched beta-1,3-d-glucans by *Schizophyllum commune*. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 193–201, 1993.

GURE, A.; SLIPPERS, B.; STENLID, J. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. **Mycological Research**, v. 109, n. 9, p. 1005–1014, set. 2005.

GUTIÉRREZ, A; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, A T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate research**, v. 281, n. 1, p. 143–54, 7 fev. 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. D. L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasioidiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 203–203, abr. 2005.

HARADA, Y. et al. Fermentation Pilot Plant. In: VOGEL, H. C.; HABER, C. C. (Eds.). **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook**. [s.l.] William Andrew, 1996. p. 1–66.

HARNACK, U. et al. Oral administration of a soluble 1-3, 1-6 beta-glucan during prophylactic survivin peptide vaccination diminishes growth of a B cell lymphoma in mice. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 11, p. 1298–303, out. 2009.

HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Evolutionary Aspects of (1,3)- β -Glucans and Related Polysaccharides. In: **Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1 \rightarrow 3)- β -Glucans and Related Polysaccharides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 655–662.

HAY, G.W., LEWIS, B.A., SMITH, F., 1965. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. 5, 357–360.

HE, P. et al. Fermentation optimization, characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Funalia trogii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 17–23, jun. 2012.

JANSSEN, M. et al. Aeration and mixing. In: **Progress in Industrial Microbiology: Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. [s.l.: s.n.]. v. 31p. 241–281.

JOSHI, M. et al. Nutrient improvement for simultaneous production of exopolysaccharide and mycelial biomass by submerged cultivation of *Schizophyllum commune* AGMJ-1 using statistical optimization. **3 Biotech**, v. 3, n. 4, p. 307–318, 24 nov. 2012.

KIHO, T. et al. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 40, n. 8, p. 2110–4, ago. 1992.

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 496–500, jul. 2006.

KIMURA, Y. et al. Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight beta-1, 3-D-glucan (branch beta-1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4131–41, 2006.

KOCHARIN, K. et al. Exobiopolymer production of *Ophiocordyceps dipterigena* BCC 2073: optimization, production in bioreactor and characterization. **BMC biotechnology**, v. 10, p. 51, jan. 2010.

KOGAN, G. (1→3, 1→6)-β-D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23, p. 107–152, 2000.

KOLLÁR, R. et al. Architecture of the yeast Cell Wall. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1170–1178, 1995.

KRCMAR, P., NOVOTNY, C., MARAIS, M., JOSELEAU, J. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **Intern. J. Biological Macromol.**, v.24, p.61-64, 1999.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–23, 20 jan. 2013.

KUMARESAN, T.; JOSHI, J. B. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. **Chemical Engineering Journal**, v. 115, n. 3, p. 173–193, jan. 2006.

LATGÉ, J. P.; CALDERONE, R. The Fungal Cell Wall. In: ESSER, K.; KUES, U.; FISCHER, R. (Eds.). **The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality**. 2nd. ed. Berlin: [s.n.]. p. 73–104.

LATGÉ, J.-P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 7, p. 863–72, jul. 2010.

LAZARIDOU, A et al. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1-2, p. 122–132, jul. 2002.

LEE, B. C. et al. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 5, p. 369–376, out. 2004.

LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural , morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathology**, v. 39, n. 2, p. 81–88, 2013.

LIN, E.-S.; CHEN, Y.-H. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2511–7, set. 2007.

LIU, S, 2013. capítulo 11. How cells grow, In.: **Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design**, Elsevier 2013.

LIU, G.-Q.; WANG, X.-L. Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 78–83, fev. 2007.

LIU, G.-Q.; ZHANG, K.-C. Enhancement of polysaccharides production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethyl acetate extracts from *Eupolyphaga sinensis* and *Catharsius molossus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 572–7, mar. 2007.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, jan. 2013.

MAJI, P. K. et al. Structural characterization and study of immunoenhancing properties of a glucan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. **Carbohydrate research**, v. 358, p. 110–5, 1 set. 2012.

MAJUMDER, A.; SINGH, A.; GOYAL, A. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 150–156, jan. 2009.

MÄKELÄINEN, H. et al. The effect of beta-glucan on the glycemic and insulin index. **European journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 6, p. 779–85, jun. 2007.

MANNERS, D. J. et al. The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. **The Biochemical journal**, v. 135, n. 1, p. 31–6, set. 1973.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. The Structure of a b-(1,3)-D-Glucan from Yeast Cell Walls. **Biochem Journal**, v. 135, p. 19–30, 1973.

MARTIN, A. M.; BAILEY, V. I. Growth of *Agaricus campestris* NRRL 2334 in the Form of Pellets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1502–1506, 1985.

MARTÍN, M.; MONTES, F. J.; GALÁN, M. A. Mass transfer rates from bubbles in stirred tanks operating with viscous fluids. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 12, p. 3814–3824, jun. 2010.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2ª ed., LTC. Rio de Janeiro, 2003.

MATTOS, A. M; YAMAMOTO, B. B.; LIMA, V. M. G. Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de exopolissacarídeo por *Lasodiplotia theobromae*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, N. 21, 2009, São José do Rio Preto. **Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica**. São José do Rio Preto.

MCINTOSH, M.; STONE, B. A; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1-->3)-beta-D-glucans. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 163–73, ago. 2005.

MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International journal of biological macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305–9, 1 out. 2009.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 2, p. 177–85, 2008.

MIERSCH, O.; SCHNEIDER, G.; SEMBDNER, G. HYDROXYLATED JASMONIC ACID AND RELATED COMPOUNDS from *Botryodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4049–4051, 1991.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959.

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

MIZUNO, T. Bioactive Substances in yamabushitake, the *Hericium erinaceus* Fungus, and its Medicinal Utilization. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, p. 1–2, 1999.

MOHSENI, M.; KAUTOLA, H.; ALLEN, D. G. The viscoelastic nature of filamentous fermentation broths and its influence on the directly measured yield stress. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 281–286, jan. 1997.

MONTEIRO, M. A et al. The first description of a (1--> 6)-beta-D-glucan in prokaryotes: (1 -> 6)-beta-D-glucan is a common component of *actinobacillus suis* and is the basis for a serotyping system. **Carbohydrate research**, v. 329, n. 1, p. 121–30, 20 out. 2000.

MOUYNA, I. et al. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 43, n. s1, p. 15–22, jan. 2005.

MUELLER, A et al. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v. 10, n. 4, p. 339–46, abr. 2000.

MYERS R. H.; MONTGOMERY. D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. Canada: John Wiley & Sons. 1995.

MUNIZ, C. R. et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: microscopical features. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 42, n. 5, p. 419–28, jul. 2011.

NANDAN, C. K. et al. Structural characterization of a water-soluble beta-(1-->6)-linked D-glucan isolated from the hot water extract of an edible mushroom, *Agaricus bitorquis*. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 18, p. 3120–3122, 8 dez. 2008.

NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 206–12, ago. 1998.

NOHALI, S.; ENCINAS, O. Association of *Diplodia mutila* with blue stain of Caribbean pine in Venezuela. **Forrest Pathology**, v. 31, p. 187–189, 2001.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47–57, jan. 2008.

OLSVIK, E.; KRISTIANSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. **Biotech. Adv.**, v. 12, p. 1–39, 1994.

OOI, v. E., LIU, F., 1999. A review of pharmacology activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1, 195–206.

OPITZ, C. A et al. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12688–93, 28 out. 2003.

OSAKU, C. A et al. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **FEMS microbiology letters**, v. 216, n. 2, p. 145–9, nov. 2002.

OSHEROV, N. I. R.; YARDEN, O. The Cell Wall of Filamentous Fungi. In: BORKOVICH, K. A.; EBBOLE, D. J. (Eds.). **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**. [s.l.: s.n.]. p. 224–237.

ÖZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8–9, p. 729–741, mar. 2001.

PALIĆ, D. et al. Immunomodulatory effects of beta-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Developmental and comparative immunology**, v. 30, n. 9, p. 817–30, jan. 2006.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, jan. 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. 1941–6, mar. 2010.

PARK, J. P. et al. Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 6, p. 433–8, jan. 2002a.

PARK, J. P. et al. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1257–1262, jun. 2002b.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 33, n. 3, p. 245–51, jul. 2004.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, 2013.

POKHREL, C.; OHGA, S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 641–646, 2007.

POLI, A. et al. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. **Archaea (Vancouver, B.C.)**, v. 2011, p. 693253, jan. 2011.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37–44, jan. 2013.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 25–30, mar. 2005.

RAU, U. et al. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 19–26, 1992.

RAU, U. Glucans secreted by fungi. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 30–36, 2004.

REESLEV, M.; JORGENSEN, B. B.; JOGENSENB, O. B. Exopolysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* grown in continuous cultivation with varying ammonium-glucose ratio in the growth medium. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 131–135, 1996.

REGAND, A. et al. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glyceimic response by modifying starch digestibility. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 297–304, nov. 2011.

REIS, R. A. et al. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. **FEMS microbiology letters**, v. 210, n. 1, p. 1–5, 23 abr. 2002.

RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J. Synergistic Interactions of Acetan with Carob or Konjac Mannan. **Macromolecules**, n. 31, p. 2539–2544, 1998.

RILEY, G. L. et al. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. **Biotechnology and bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 160–72, 20 abr. 2000.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento Experimental e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Cárita Editora, 2005

RODRÍGUEZ PORCEL, E. M. et al. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 139–144, nov. 2005.

ROUKAS, T.; MANTZOURIDOU, F. Effect of the aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheological properties in an airlift reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. February 2000, p. 371–376, 2001.

ROUT, D. et al. Chemical analysis of a new (1-->3)-, (1-->6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydrate research**, v. 340, n. 16, p. 2533–9, 21 nov. 2005.

SANTOS-NEVES, J. C. et al. A gel-forming beta-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 9, p. 1456–62, 7 jul. 2008.

SASSAKI, G. L. et al. Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 4, p. 385–389, jun. 2002.

SASSAKI, G. L. et al. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate research**, v. 340, n. 4, p. 731–9, 21 mar. 2005.

SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**: Engenharia Bioquímica. Editora Edgard Blucher. 2001. 560 p. Volume 2.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**: fundamentos teóricos e práticos. Editora Artliber. 2006. 235 páginas.

SCHÜGERL, K. **Bioreaction Engineering**, volume 2: Characteristics Features of Bioreactors. John Wiley and Sons, 1987.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in microbiology**, v. 153, n. 9, p. 585–92, nov. 2002.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glaucanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51–5, jan. 2002.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors. **Journal of applied microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1074–81, jan. 2004.

SELBMANN, L.; STINGELE, F.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 2, p. 135–45, jan. 2003.

SEUNG, S. **I am my connectome**. TED Global, julho. 2010. Palestra

SEVIOUR, R. J. et al. Production of Pullulan and other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 279–298, jan. 1992.

SEVIOUR, R. J. et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. **Critical reviews in biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 170–85, jun. 2011.

SHIH, I.-L.; PAN, K.; HSIEH, C. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1129–1135, maio 2006.

SILVA, M. L. C. et al. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 4, p. 793–8, 17 mar. 2008.

SINHA, J. et al. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6-7, p. 392–399, out. 2001.

SMIDERLE, F. R. et al. Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2189–96, out. 2006.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European journal of pharmacology**, v. 597, n. 1-3, p. 86–91, 12 nov. 2008.

SMIDERLE, F. R. et al. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 58, jan. 2011.

SMIDERLE, F. R. **Polissacarídeos produzidos por basidiomicetos e ascomiceto: Caracterização estrutural e atividade imunomoduladora**. [s.l.: s.n.].

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, jan. 2012.

SMIDERLE, F. R. et al. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 91–9, 15 abr. 2013.

STASINOPOULOS, S. J.; SEVIOUR, R. J. Exopolysaccharide production by *Acremonium persicum* in stirred-tank reactor and air lift fermentors. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 465–468, 1992.

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. 480–6, jan. 2004.

STONE, B. A. Chemistry of β -Glucans. In: **Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1→3)- β -Glucans and Related Polysaccharides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 5–46.

SUGAWARA, T. et al. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 13, p. 2255–65, 13 set. 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, jan. 2004.

SUMNER, J. L.; MORGAN, E. D. The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi in the order mucorales. **Journal of general microbiology**, v. 59, n. 2, p. 215–21, dez. 1969.

SUN, Y. et al. A polysaccharide from the fungi of *Huaier* exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 577–82, 30 jan. 2013.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41–6, jan. 1998.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 30 jan. 2013.

TAKAHASHI, K. et al. Involvement of the accumulation of sucrose and the synthesis of cell wall polysaccharides in the expansion of potato cells in response to jasmonic acid. **Plant Science**, v. 111, n. 1, p. 11–18, out. 1995.

TANG, Y. et al. Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors – Challenges , Current State-of-the-Art , and Future Prospects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 221–229, 2007.

TECLU, D. et al. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **Journal of hazardous materials**, v. 161, n. 2-3, p. 1157–65, 30 jan. 2009.

THOMAS, C. R. Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. **Trends in biotechnology**, v. 10, n. 10, p. 343–8, out. 1992.

TODARO, C. L. Centrifugation. In: VOGEL, H. C.; HABER, C. C. (Eds.). **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook**. [s.l.] William Andrew, 1996. p. 558–589.

TONELI, J. T. C. de L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. **Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos**. Rev. Bras. Prod. Agroind., v. 7, p. 181-204, 2005.

TOSIN, F. F. S. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica*: Caracterização estrutural e análises reológicas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2008.

TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 2019–23, dez. 2010.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents : Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523–533, 2000.

UKAWA, Y.; ITO, H.; HISAMATSU, M. antitumor effects of (1,3) beta d glucan and (1,6) beta d glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 98–104, 2000.

VAN RIET, K.; VAN DER LANS, R. G. J. M. Mixing in Bioreactor Vessels. In: **Comprehensive Biotechnology**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2011. v. 1p. 63–80.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Three exopolysaccharides of the beta-(1-->6)-D-glucan type and a beta-(1-->3;1-->6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–5, 22 set. 2008.

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, 15 fev. 2013.

VELJKOVIC, V.; LAZIĆ, M.; SKALA, D. Studies on dextran fermentation broth rheology. **Enzyme and microbial technology**, v. 10, p. 686–688, 1988.

VESENTINI, D.; DICKINSON, D. J.; MURPHY, R. J. The protective role of the extracellular mucilaginous material (ECMM) from two wood-rotting basidiomycetes against copper toxicity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 1, p. 1–7, jul. 2007.

VINOGRADOV, E. et al. Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BROI, and LH1. **Carbohydrate research**, v. 379, p. 7–12, 20 set. 2013.

VOGEL, H. J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbial Genetic Bulletin**. 13: 42-43.

WANG, X.; ZHANG, L. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 16, p. 2209–16, 2 nov. 2009.

WANG, Y.; MCNEIL, B. Production of the Fungal Exopolysaccharide Scleroglucan by Cultivation of *Sclerotium glaucum* in air lift reactor with an External Loop. **Journal of Technology and Biotechnology**, v. 63, p. 215–222, 1995.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258–74, nov. 2002.

WHITE, E.B. Coon Tree. **The Points of My Compass**: Letters from the East, the West, the North, the South. 1962.

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, jan. 2008.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, 2, 211-215. 1963b.

_____. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, 2, 62-68. 1963a.

WUCHERPFENNIG, T. et al. Morphology and rheology in filamentous cultivations. **Advances in applied microbiology**, v. 72, n. 10, p. 89–136, jan. 2010.

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. 124–32, 20 jan. 2013.

XIANG, Y.; XU, X.; LI, J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1899–905, 15 out. 2012.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, jan. 2007.

ZHANG, M.; KIM, J. A. Effect of molecular size and modification pattern on the internalization of water soluble β -(1→3)-(1→4)-glucan by primary murine macrophages. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 6, p. 914–927, jun. 2012.

ZHONG, J.-J. Recent advances in bioreactor engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 4, p. 1035–1041, 24 jun. 2010.

ZHU, H. et al. A three-stage culture process for improved exopolysaccharide production by *Tremella fuciformis*. **Bioresource technology**, v. 116, p. 526–8, jul. 2012.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALEXOPOULOS, A. **Introductory Mycology**. Wiley India Pvt. Limited, 2007. 880 páginas.
- BACIC, A.; FINCHER, G. B. STONE, B. A. **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. Academic Press, 2009. 350 páginas.
- BARKER, K. **At the Bench: A Laboratory Navigator**, I.K. International Publishing House, 2004.
- BARROS NETO, B. SCARMINIO, I. S., BRUNS R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora Bookman, 2010.
- BASMADJIAN, D. **The art of modeling in science and engineering**. Chapman Hall. 1999. 658p.
- BONONI, V. L. R. **Zygomycetos, basidiomicetos e deuteromicetos**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente.
- BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. Editora Edgard Blucher. 2001. Volume 1
- BROWN, T. L. LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E. BURDGE, J. R. **Química**. Pearson Educación, 2004. 1152 páginas.
- COGHILL, A. M.; GARSON, L. R. **The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information**. American Chemistry Society, 2006. 430 páginas.
- DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K.; GAIKAR, V. G. **Biotransformations and Bioprocesses**. CRC Press, 2004. 406 páginas.
- HESHAM A. EL-ENSHASY. Capítulo 9. Filamentous Fungal Cultures. In.: **Process Characteristics, Products, and Applications Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Shang-Tian Yang. Elsevier, 2007.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Editora Artmed. 2010. 12 edição. 1160p.
- MARCOZZO, A. TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2 edição. Guanabara Koogan. 1999. p. 355.
- MARIANO JR, G. S; ENRIQUE, B. A.; HUGO, J. I. JOSE, N. B.. ELOY, B. C., RAMIRO, R. M. Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures. In.: Guevara-González, R. G., Torres-Pacheco I. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**. Kerala, India. Research Signpost, 2006. 18p.
- MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Practical Fermentation Technology**. John Wiley & Sons. 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Editora Artmed. 1008. 600 páginas.

SUTHERLAND, I W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides** Cambridge University Press. 2003.

VOGEL, H. C.; TODARO, C. L. **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment**. Editora William Andrew. 1996. 828 páginas.

VOLPATO, G. L. **Dicas para redação científica**. Editora Cultura Academica, 2010. 152 páginas.

WAINWRIGHT, M. **Introduccion A La Biotecnologia De Los Hongos**. Acribia Editorial. 1995. 242 paginas.

WEBSTER, J. WEBER, R. W. S. **Introduction to fungi**. Nova York: Cambridge University Press. 2007. 875p.