



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSANGELA MARIA STELUTI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO
EXOPOLISSACARÍDEO SECRETADO PELO ASCOMICETO
*BOTRYOSPHERIA SP***

Londrina
2004

ROSANGELA MARIA STELUTI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO
EXOPOLISSACARÍDEO SECRETADO PELO ASCOMICETO
*BOTRYOSPHAERIA SP***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi
Custódio da Silva

Londrina
2004

ROSANGELA MARIA STELUTI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO
EXOPOLISSACARÍDEO SECRETADO PELO ASCOMICETO
*BOTRYOSPHERA SP***

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

Profa. Dra. Maria Célia de Oliveira Haully

Londrina, 26 de abril de 2004

DEDICATÓRIA

Com muito amor aos meus queridos filhos Gabriel, Milena e Vitor, e esposo José Antônio, por todo o tempo que não lhes dediquei e pela compreensão e ajuda indispensáveis para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, me iluminar nas decisões, orientar-me a seguir os melhores caminhos e me dar forças e coragem para não desistir diante das dificuldades.

Aos meus pais Lauro (*in memoriam*) e Zenir por todo o amor, a dedicação, a doação e pelos exemplos de vida que sempre representaram para mim.

À minha querida família, José Antônio, Gabriel, Milena e Vitor, por ter compreendido a necessidade da minha ausência para a realização deste trabalho.

Às minhas orientadoras Dra Aneli de Melo Barbosa e Dra Maria de Lourdes Corradi da Silva pelas excelentes orientações, pelos exemplos de dedicação e competência, pelo incentivo constante, pela paciência diante das minhas dificuldades e especialmente por toda a ajuda dispensada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu esposo José Antônio pelas noites mal dormidas e pela importantíssima ajuda nos trabalhos de digitação.

À minha auxiliar e amiga, D. Eva, por ter realizado suas tarefas com competência, responsabilidade, amor e dedicação, cuidando da minha família e proporcionando-me tranquilidade para que eu viajasse a Londrina.

À minha querida amiga Cidinha, e aos tios Marinei e Haroldo, pela companhia e cuidado com os meus filhos durante alguns dias nos quais estive ausente.

Às minhas irmãs Regilene e Emiliana, minha mãe Zenir e minha sogra Marione, por todo apoio e pelos cuidados com meus filhos nos momentos de necessidade, durante a realização deste trabalho.

À querida D. Ercy, que me acolheu com muito carinho em sua casa.

Aos técnicos Marilsa, do laboratório de Bioquímica da UNESP - Pres. Prudente, e Néelson, do laboratório de Bioquímica da UEL - Londrina, pela competência e dedicação exemplares, e por não medirem esforços diante das minhas necessidades nos laboratórios.

Aos amigos Ellen e Luis Gustavo, pela ajuda valiosa nos experimentos de laboratório.

Aos colegas Renata, Leila, Marciane, Raquel, Luciana e Francis, pelo companheirismo e agradável convivência durante todo o curso de mestrado.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia, que contribuíram para a elevação dos nossos conhecimentos nesta área, com muita dedicação e atenção a nós dispensada.

Ao Dr. Aldo Job, do Depto de Física, Química e Biologia – UNESP- Presidente Prudente, pelas análises de FTIR.

Aos professores, Dr. Marcelo Iacomini, da Universidade Federal do Paraná – Curitiba, e Dr. Gil V. J. da Silva, da USP – Ribeirão Preto pela realização das análises de ressonância magnética nuclear.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

STELUTI, Rosangela Maria. **Produção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo secretado pelo Ascomiceto *Botryosphaeria* SP.** 2004. 122f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

RESUMO

A influência da concentração de glicose e de outras fontes de carboidratos (monossacarídeos: frutose, galactose, manose; polióis: manitol e sorbitol; dissacarídeos: lactose, sacarose e sacarose comercial e melão de indústria açucareira) foram comparados, separadamente, como únicas fontes de carbono para a produção de Botriosferana, um exopolissacarídeo (EPS) produzido pelo *Botryosphaeria* sp. A concentração ótima de glicose para a produção do EPS foi 50g L⁻¹. Com exceção do manitol, o fungo produziu EPS em todas as fontes de carbono estudadas e as maiores produções ocorreram em sacarose, seguida da glicose. As análises por FTIR demonstraram que todos os EPS produzidos pelo *Botryosphaeria* sp., nas diferentes fontes de carbono são essencialmente glucanas do tipo β. O Botriosferana produzido em glicose como única fonte de carbono, foi isolado do fluido extracelular através de precipitação com etanol, purificado por cromatografia de filtração em gel, tendo produzido uma fração rica em carboidrato (96%) composta principalmente de glicose (98%). Os espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear ¹³C mostraram que todas as ligações glicosídicas estavam na configuração β. Os dados das análises de metilação e degradação de Smith indicaram que este polímero é uma glucana β-D-(1→3) com aproximadamente 22% de ramificações em C-6. Os produtos obtidos a partir da hidrólise ácida parcial demonstraram que as ramificações consistem de unidades glucopiranosídicas e gentiobiosídicas (1→6) ligadas.

Palavras-chave: Biotecnologia. Glucanas. Polissacarídeos. Ascomicetos. Fungos. Microbiologia industrial.

STELUTI, Rosangela Maria. **Produção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo secretado pelo Ascomiceto *Botryosphaeria* SP.** 2004. 122f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ABSTRACT

The influence of glucose concentration and other carbohydrates (monosaccharides: fructose, galactose, mannose; polyols: mannitol and sorbitol; disaccharides: lactose, sucrose and commercial sucrose; and industrial sugarcane molaless) were compared as sole carbon sources for the production of Botryosphaeran, an exopolysaccharide (EPS) produced by *Botryosphaeria* sp. The optimum glucose concentration for EPS production was 50g L⁻¹. With the exception of mannitol, the fungus produced EPS on all carbon sources studied, with highest yields occurring with sucrose followed by glucose. All EPS showed exclusively glucose after acid hydrolysis and monosaccharides analysis. FTIR spectroscopy demonstrated the presence of β -anomers indicating that all the EPS produced by *Botryosphaeria* sp. on the different carbon sources were essentially β -D-glucan type. The Botryosphaeran produced on glucose as sole carbon source, was isolated from the extracellular fluid by precipitation with ethanol, and purified by gel permeation chromatography to yield a carbohydrate-rich fraction (96%) composed mainly of glucose (98%). Infra-red and ¹³C-NMR spectroscopy showed that all the glucosidic linkages were in the β -configuration. Data from methylation analysis and Smith degradation indicated that the EPS is a β -(1→3)-D-glucan with approximately 22% side branching on C-6. The products obtained from partial acid hydrolysis demonstrated that the side branches consist of single (1→6)- β - linked glucosyl, and (1→6)- β - linked gentiobiosyl residues.

Keywords: Biotechnology. Glucanas. Polysaccharides. Ascomicetos. Fungi. Industrial microbiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

sp. – espécie

EPS – exopolissacarídeo

HPAEC – high performance anionic exchange chromatography

PAD – pulsed amperometric detection (detecção por amperometria pulsada)

r.m.n. – ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono treze

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

c.l.g. – e.m. – cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

m/v – massa/volume

v/v – volume/volume

cm – centímetro

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

M – molar

g – grama

h – hora

s – segundo

r.p.m. – rotações por minuto

p.p.m. (δ) – partes por milhão (delta)

FF – fast flow

MWCO – molecular weight cut off

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

Da – daltons

KDa – quilo dalton

nm – nanômetro

α – alfa

β – beta

μg – micrograma

μL – microlitro

ng – nanograma

SEC – size exclusion chromatography

MALLS – multiangle laser light scattering

LALLS – low angle laser light scattering

DEAE-Sepharose – dietilaminoetil Sepharose

Sepharose – gel de agarose marca Sephadex

BSA – proteína albumina bovina

BDA – batata-dextrose-ágar

NaBH₄ – boroidreto de sódio

DMSO – dimetil sulfóxido

NaIO₄ – metaperiodato de sódio

TFA – ácido trifluoracético

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 3.1 POLISSACARÍDEOS | 16 |
| 3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS E SUAS PROPRIEDADES GERAIS | 17 |
| 3.2.1 β -glucanas | 19 |
| 3.2.2 Principais Exopolissacarídeos produzidos por bactérias e suas aplicações | 20 |
| 3.2.3 Principais Exopolissacarídeos produzidos por fungos e suas aplicações | 23 |
| 3.3 EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>BOTRYOSPHAERIA SP</i> | 25 |
| 3.4 SÍNTESE DE B-GLUCANAS POR FUNGOS | 26 |
| 3.5 FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS FÚNGICOS | 28 |
| 3.6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPS FÚNGICOS | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 MATERIAIS | 39 |
| 4.1.1 Microrganismo | 39 |
| 4.1.2 Reagentes | 39 |
| 4.1.3 Equipamentos | 40 |
| 4.2 MÉTODOS GERAIS | 41 |
| 4.2.1 Meios de Cultivo | 41 |
| 4.2.1.1 Meio mínimo de Vogel | 41 |
| 4.2.1.2 Meio Batata-ágar-dextrose | 42 |
| 4.2.2 Manutenção do Microrganismo | 42 |
| 4.2.3 Preparo do Inóculo do <i>Botryosphaeria sp.</i> | 42 |
| 4.2.4 Avaliação de Diferentes Fontes de Carbono na Produção de EPS pelo <i>B.sp.</i> | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.5 Produção do Exopolissacarídeo pelo <i>B. sp.</i> em Glucose como Única Fonte de Carbono, para Caracterização Estrutural | 43 |
| 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 44 |
| 4.3.1 Determinação da Biomassa Fúngica..... | 44 |
| 4.3.2 Quantificação dos Polissacarídeos Produzidos pelo <i>B. sp</i> em Diferentes Fontes de Carbono | 44 |
| 4.3.3 Determinação de Açúcares Redutores..... | 45 |
| 4.3.4 Determinação de Açúcares Totais | 45 |
| 4.3.5 Determinação de Proteínas- Método de Bradford | 46 |
| 4.3.6 Espectrofotometria direta a 280 nm | 47 |
| 4.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO..... | 47 |
| 4.4.1 PURIFICAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO DO <i>B.SP.</i> POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS | 47 |
| 4.4.1.1 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sepharose CL-4B | 47 |
| 4.4.1.2 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sepharose (FF)..... | 48 |
| 4.4.2 Análise da Composição em Monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC) | 48 |
| 4.4.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO PELO MÉTODO DE HAKOMORI | 49 |
| 4.4.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C | 50 |
| 4.4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 51 |
| 4.4.6 Degradação de Smith..... | 51 |
| 4.4.7 Hidrólise ácida parcial..... | 52 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 55 |
| REFERÊNCIAS | 56 |
| ANEXOS | 66 |

| | |
|---|-----|
| ANEXO A – Artigo 1: Comparison of Botryosphaeran production by ascomyceteous fungus <i>Botryosphaeria</i> sp., grown different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features | 67 |
| ANEXO B – Artigo 2: Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6) -β-D-glucan produced by ascomyceteous fungus, <i>Botryosphaeria</i> sp..... | 84 |
| ANEXO C – Instruções para preparação e encaminhamento de artigos científicos para publicação em periódicos | 105 |
| ANEXO D – Cópia da publicação do artigo 2 no periódico Carbohydrate Research | 114 |

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são carboidratos amplamente produzidos por microrganismos. Estes polímeros podem permanecer ligados à superfície celular ou ser encontrados no meio extracelular como substância amorfa e viscosa (WILLIAMS, 1997). Em ambientes naturais, nos quais os microrganismos são encontrados, os EPS podem estar associados com a sua virulência, promovendo a interação microrganismo-planta. Também atuam como biofilmes conferindo funções de estrutura e proteção à célula microbiana contra desidratação ou ataque por bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1998). Além disso, auxiliam as bactérias fixadoras de nitrogênio durante a nodulação das raízes de plantas leguminosas (MENDRYGAL; GONZALEZ, 2000).

Os EPS microbianos possuem propriedades reológicas interessantes, são estáveis em temperaturas elevadas, em ampla faixa de pH e também em altas concentrações iônicas. Tais propriedades ampliam e favorecem suas aplicações comerciais (SELBMANN et al., 2002). Muitas bactérias têm sido utilizadas na produção industrial de alguns polissacarídeos como xantana, dextrana, gelana, curdlana, que podem ser aplicados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, especialmente como espessantes. Por exemplo, as bactérias lácticas produzem secreções que dão textura e consistência para alimentos fermentados (MACEDO et al., 2002). Os EPS também podem ser produzidos por fungos, porém em quantidades menores quando comparados às bactérias (SEVIOUR et al., 1992; SUTHERLAND, 1998).

O interesse crescente no estudo dos EPS fúngicos, especialmente aqueles presentes nos corpos de frutificação (cogumelos) de basidiomicetos, deve-se ao seu emprego terapêutico na medicina popular, tradicional entre os chineses e japoneses, por seus efeitos cicatrizantes no tratamento de certas doenças humanas, incluindo cânceres. Suas principais propriedades estão relacionadas com atividades biológicas anti-tumorais, anti-inflamatórias e imuno-moduladoras, através da estimulação de diferentes respostas imunológicas no hospedeiro (WASSER, 2002). Um grupo de substâncias carcinostáticas tem sido identificado em vários cogumelos e está ligado a glucanas do tipo β , especialmente (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6). Estes polissacarídeos têm sido considerados úteis em imunoterapia (SUTHERLAND, 1990; WASSER, 2002). Também

tem sido demonstrada uma atividade hipoglicêmica para algumas glucanas fúngicas (BAO; FANG; LI, 2001).

A química e a biologia das glucanas β -(1 \rightarrow 3) têm sido discutidas em detalhes por Stone e Clarke (1992), e sua estrutura e atividade biológica revisadas por Yadomae (2000) e Wasser (2002). As glucanas fúngicas do tipo β também atuam como agentes fitotóxicos causando doenças em plantas (RAMOS et al., 1997), podendo também agir como inibidores vírus na prevenção de doenças em plantas (ROUHIER et al., 1995) e em células animais, como por exemplo, contra o vírus da rubéola (MARCHETTI et al., 1996) e herpes (MASTROMARINO et al., 1997).

Os fungos pertencentes ao gênero *Botryosphaeria* têm sido estudados principalmente como patógenos de plantas, causando várias doenças em árvores cuja madeira tem emprego comercial, incluindo-se aquelas utilizadas em reflorestamento, como eucalipto (YUAN; MOHAMMED, 1997). Estes fungos produzem EPS que podem estar diretamente ligados à sua patogenicidade, uma vez que sintetizam uma goma que bloqueia os vasos lenhosos das árvores, levando à morte de galhos, e em seguida, a morte completa da árvore. Também podem ser encontrados em frutas, promovendo o apodrecimento das mesmas durante o armazenamento (RAMOS et al., 1997).

O ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (isolado MAMB-05), foi isolado de cancro de eucalipto, é um fungo ligninolítico (BARBOSA; DEKKER; ST HARDY, 1996) uma vez que é produtor de lacases (DEKKER et al, 2001). O primeiro relato sobre a produção de exopolissacarídeo pelo *Botryosphaeria* sp foi feito por Dekker e Barbosa (2001), quando cultivaram o *Botryosphaeria* sp em 4% (p/v) de glucose e, através de hidrólise enzimática, constataram que o EPS produzido tratava-se de uma β -glucana. Entretanto, estudos sobre a caracterização estrutural deste EPS não tinham até então sido desenvolvidos, assim como o efeito de outras fontes de carbono na produção desta β -glucana que consta dentre os objetivos deste trabalho, conforme descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes fontes de carbono para a produção de exopolissacarídeo e de biomassa pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp. Produzir, purificar e caracterizar estruturalmente o EPS secretado pelo microrganismo em estudo, quando cultivado em glucose como única fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Comparar a produção de EPS e de biomassa fúngica pelo *Botryosphaeria* sp., quando cultivado em diferentes fontes de carbono como: glucose, frutose, manose, galactose, sacarose, sacarose comercial, lactose, manitol, sorbitol e melão de cana-de-açúcar.

2.2.2. Produzir o EPS de *Botryosphaeria* sp. utilizando glucose como única fonte de carbono.

2.2.3. Purificar o polissacarídeo, adequadamente, até homogeneidade.

2.2.4. Determinar a composição monossacarídica do EPS purificado.

2.2.5. Determinar a configuração e a posição das ligações glicosídicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, formadas a partir da eliminação de uma molécula de água entre o grupo hidroxila hemiacetal de um resíduo e um grupo hidroxila primário ou secundário de outro resíduo adjacente. Podem ser formados por números variáveis de resíduos em uma estrutura linear, ramificada, ou ocasionalmente cíclica e sua massa molecular pode variar de milhares a milhões de daltons (PAZUR, 1994). Diferem-se entre si em função de suas unidades monossacarídicas, do comprimento de suas cadeias, do tipo de ligação glicosídica e do grau de ramificação. Esses polímeros podem ser denominados de homopolissacarídeos quando constituídos de um único tipo de unidade monomérica, ou de heteropolissacarídeos, quando vários monômeros quimicamente diferentes são encontrados (MARGARITS; PACE, 1985).

Pelo fato de os polissacarídeos não serem sintetizados de acordo com um molde genético, eles tendem a ser muito mais heterogêneos, tanto em tamanho quanto em composição, quando comparados a outras moléculas biológicas. O programa de síntese dessas macromoléculas é intrínseco às enzimas que catalisam a polimerização das unidades monoméricas. A ação alternada de várias enzimas produz um polímero com seqüência repetitiva precisa, porém o comprimento exato da cadeia varia de molécula para molécula (DOUGLAS, 2001). Entretanto, a variação estrutural própria dos carboidratos é fundamental para a sua atividade biológica. O entendimento da sua estrutura, desde o mais simples monossacarídeo até o mais complexo polissacarídeo ramificado, é essencial para o reconhecimento das diversas funções dos carboidratos nos sistemas biológicos (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Em organismos vivos, os polissacarídeos podem estar covalentemente combinados com membros de outras classes de compostos, principalmente proteínas e lipídeos. Sob a forma combinada ou mesmo livres, essas moléculas têm importantes funções biológicas. Podem servir como reserva energética em células animais ou vegetais, como elementos estruturais das paredes de células vegetais, de microrganismos e de exoesqueletos de animais,

como matriz extracelular fornecendo proteção, forma e suporte aos tecidos e órgãos, como substância lubrificante por sua alta viscosidade em algumas secreções extracelulares, entre outras (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS E SUAS PROPRIEDADES GERAIS

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros extracelulares produzidos por muitos microrganismos, principalmente bactérias, além de fungos e algas. São encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio extracelular como secreções viscosas (SUTHERLAND, 1998).

Os polissacarídeos obtidos de microrganismos são uma alternativa valiosa, pois possuem propriedades similares ou superiores aos tradicionais que são, geralmente, de origem vegetal e de algas marinhas e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que os qualificam para o desenvolvimento de novos produtos, por exemplo, após uma derivatização química. Os EPS microbianos não ficam expostos às alterações climáticas, à contaminação marinha ou problemas nas colheitas, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais (SEVIOUR et al., 1992). Além disso, são menos susceptíveis à variabilidade em suas propriedades químicas e físicas, mantendo o padrão de qualidade, pois a sua produção pode ser controlada cuidadosamente e sua recuperação e purificação apresentam dificuldades menores, comparadas aos vegetais. Finalmente, existem técnicas genéticas que permitem obter polissacarídeos microbianos com propriedades pré-determinadas, as quais nos vegetais ainda não são possíveis (SHAH et al., 2000; SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002).

Atualmente, vários EPS microbianos são amplamente aceitos como produtos da biotecnologia, enquanto outros estão em diferentes estágios de desenvolvimento. Embora os EPS microbianos apresentem todas as vantagens citadas acima, o custo de produção para a maioria deles ainda é relativamente alto, em relação àqueles obtidos de vegetais e algas marinhas, devido aos processos de produção que são intensivos em capital e energia. Portanto, existem poucos microrganismos que produzem EPS com rendimentos satisfatórios para o desenvolvimento em

escala industrial; conseqüentemente, a exploração comercial ainda é baixa. Porém, para alguns polímeros, a relação custo/benefício justifica a produção, por possuírem propriedades químicas e físicas únicas ou superiores a dos polissacarídeos tradicionais (SEVIOUR et al., 1992; SUTHERLAND, 1998). Incluem-se entre essas propriedades a alta viscosidade, o poder geleificante maior, a compatibilidade com uma grande variedade de sais em uma ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas, a alta solubilidade em água, como também a ação sinérgica com outros polissacarídeos (SELBMANN et al., 2002).

Todas estas propriedades são diretamente dependentes das características químicas, físicas e estruturais de cada polímero, como: massa molecular (número de resíduos por molécula), configuração anomérica (alfa ou beta), conformação (linear, ramificada, helicoidal, associação entre cadeias), a presença de grupamentos (hidroxila, carboxila, entre outros), o tipo de monômero, o grau de substituição destes monômeros, a posição das ligações glicosídicas entre os resíduos, entre outras. A caracterização química dos polímeros é necessária para o direcionamento de suas aplicações comerciais (PAZUR, 1994; BeMILLER; WHISTLER, 1996).

Entre os polissacarídeos microbianos com usos comerciais, podem ser citados dextrana, xantana, alginato, curdlana e gelana, de origem bacteriana; escleroglucana e pululana, sintetizados por fungos. Muitos outros polímeros ainda se encontram em fase de estudo e apresentam elevado potencial de aplicação biotecnológica (MAUGERI FILHO, 2001).

A indústria de alimentos é uma das principais consumidoras de EPS microbianos, os quais são muito valorizados e requeridos nesta área de aplicação, por suas propriedades funcionais e reológicas de pseudoplastia e tixotropia, dependentes de sua viscosidade. São empregados principalmente como espessantes, agentes de suspensão e geleificantes, porém, são muito importantes também por seus efeitos secundários que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, encapsulação, formação de filmes, lubrificação, dispersão de partículas, adsorção de água, entre outros (MORRIS, 1992; MACEDO et al., 2002). Estas propriedades ampliam as áreas de aplicações dos EPS microbianos, que atualmente também são requeridos em indústrias de bebidas, farmacêuticas, petrolíferas, de materiais para construção civil, e muitas outras (SELBMANN et al., 2002).

Muitos dos EPS microbianos são glucanas, os quais são polímeros de glucose amplamente distribuídos na natureza e classificados conforme o tipo de ligação glicosídica: α ou β na cadeia principal do polímero. Eles também podem ser encontrados nas paredes celulares de

plantas, bactérias e fungos e, em menor quantidade, como componentes do citossol fúngico. (WILLIAMS, 1997).

3.2.1 Beta-glucanas

As β -glucanas são a forma predominante de polímeros encontradas em fungos. Na parede celular desses microrganismos, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) apresentam-se ligadas a proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos como a manana. Além disso, elas eventualmente possuem ramificações com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6). A conformação destas moléculas pode variar desde hélice simples até tripla hélice, que é a forma mais comumente encontrada, onde as três cadeias de polímeros são estabilizadas por ligações de hidrogênio nos oxigênios dos C-2 (WILLIAMS, 1997).

Embora apresentem propriedades reológicas interessantes, o principal interesse sobre as glucanas β -(1 \rightarrow 3) está relacionado com suas propriedades terapêuticas, atuando como moduladores do sistema imunológico. Possuem atividade anti-tumoral e também contra infecções bacterianas e virais. Estas glucanas impedem a oncogênese e a metástase de tumores. Esta atividade é especialmente benéfica, quando usada clinicamente em associação com quimioterapia. As glucanas β -(1 \rightarrow 3) não atacam diretamente as células cancerosas, mas exercem seu efeito anti-tumoral por ativação de diferentes respostas de defesa do hospedeiro (YANG; KE; KUO, 2000; WASSER, 2002). O mecanismo de inibição do crescimento de tumores ainda não está completamente esclarecido mas, as mais importantes características para esta atividade parecem ser a conformação em tripla-hélice adotada pela glucana β -(1 \rightarrow 3), a massa molecular e o número e arranjo das cadeias laterais (SUTHERLAND, 1998; FALCH et al., 2000; SCHMID et al., 2001), entretanto, algumas glucanas β -(1 \rightarrow 3) que apresentam cadeia linear, também possuem atividade tumoricida como, por exemplo, a curdlana do procarioto *Alcaligenes faecalis* (SEVIOUR, 1992).

Os estudos a respeito dos efeitos imunológicos das glucanas β -D-(1 \rightarrow 3) foram inicialmente realizados por Benacerraf e colaboradores(1959) (apud WILLIAMS, 1997), os quais demonstraram que a zimosana, uma glucomanana isolada de *Saccharomyces cerevisiae*, produziu

uma marcante hiperplasia e hiperfuncionalidade em macrófagos. Outros pesquisadores confirmaram estes estudos e, Riggi e Di Luzio (1961) (apud WILLIAMS, 1997), demonstraram que uma glucana β -(1 \rightarrow 3) foi o agente estimulante dos macrófagos presente na zimosana. Numerosos estudos têm mostrado que os polímeros de glucana β -(1 \rightarrow 3) potencializam a função de macrófagos, além de neutrófilos e outros imunócitos, e estas observações têm estimulado as investigações sobre o potencial para as aplicações biomédicas das glucanas β -(1 \rightarrow 3) (WILLIAMS, 1997).

Lamentavelmente, também foram relatados efeitos toxicológicos após administração sistêmica (endovenosa) destes polímeros, que usualmente se apresentam como micropartículas insolúveis em água. Foram observados formação de granuloma associado à hipertrofia e hiperplasia de órgãos como fígado, pulmão e baço. Interessantemente, muitos trabalhos têm demonstrado que a conversão das glucanas β -(1 \rightarrow 3) para a forma solúvel preserva a atividade imunológica e elimina os efeitos indesejáveis (WILLIAMS, 1997). Além disso, o aumento da solubilidade de alguns exopolissacarídeos fúngicos, através da modificação estrutural dos resíduos D -glucosídicos nas cadeias laterais, potencializam sua atividade tumoricida (SEVIOUR, 1992; SUTHERLAND, 1998; WASSER, 2002). Foi verificado que a pestalotana, uma glucana β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) altamente ramificada, produzida pelo fungo *Pestalotia* sp., é insolúvel em água após seu isolamento do meio cultivo seguido por desidratação, além de apresentar moderada atividade contra o crescimento de tumores implantados em ratos. Entretanto, quando os grupos D-glucosídicos das cadeias laterais foram modificados por oxidação por periodato e redução por boridreto de sódio, o composto resultante, uma D-glucana polioliol, exibiu uma potente atividade anti-tumoral, confirmando que a ligação de muitos grupos polihidroxilados à cadeia principal da glucana β -D-(1 \rightarrow 3) resulta em acentuado aumento na atividade anti-tumoral das D-glucanas ramificadas (MISAKI et al., 1984).

3.2.2 Principais Exopolissacarídeos produzidos por Bactérias e suas Aplicações

As primeiras observações sobre os exopolissacarídeos ocorreram no início do século XIX, quando constatou-se que os xaropes de cana-de-açúcar e de beterraba tomavam uma

textura quase sólida, dificultando o processamento do açúcar nas fases de filtração e cristalização. Pasteur (1861) (apud MAUGERI FILHO, 2001) notou que esse fenômeno era causado por ação microbiana e a bactéria envolvida foi identificada como *Leuconostoc mesenteroides*. O produto desta fermentação era uma glucana e foi denominado de dextrana devido à sua similaridade com a dextrina. Outras bactérias do gênero *Leuconostoc* também são produtoras de dextrana, *L. dextranicum* e *L. citrovorum*, além de *Streptococcus bovis* e *Streptococcus* NRRL (De La ROSA, 1998).

A dextrana é um homopolissacarídeo neutro que possui 95% de ligações α -(1 \rightarrow 6) na cadeia principal e 5% de ramificações com ligações α -(1 \rightarrow 3). Foi o primeiro biopolímero produzido em larga escala e atualmente continua ocupando os primeiros lugares em produção comercial. As dextranas de massa molecular elevada são principalmente empregadas como estabilizantes e agentes de viscosidade na indústria de alimentos, como filmes protetores para sementes, além de participar de processos metalúrgicos e também na indústria petrolífera (SIDEBOTHAM, 1974; ROBYT, 1986). As dextranas de baixa massa molecular possuem um mercado importante na indústria farmacêutica, como expensor volumétrico do sangue (plasma sangüíneo artificial). Após derivatização química, podem ser utilizadas como anti-coagulantes, no combate a anemias e na redução do colesterol (VILOCHE-BAZAN, 1994). Em laboratórios de pesquisa, as dextranas são extensivamente utilizadas como géis de filtração em cromatografia (Sephadex). Atualmente, novos mercados começam a ser explorados para as oligodextranas, como o uso em cosméticos, como açúcar dietético e prebióticos. (LOPEZ,1993).

A xantana é um heteropolissacarídeo ramificado produzido principalmente por *Xanthomonas campestris*, além de outras bactérias do mesmo gênero. É constituído por uma cadeia principal semelhante à celulose, contendo resíduos de glucose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4) e com cadeias laterais, alternadas em C-3, constituídas por trissacarídeo (manose-ácido glucurônico-manose), os quais são geralmente modificados por ligação com acetato e piruvato nos resíduos de manose (KAWAHARA; OBATA, 1998). Por sua alta viscosidade em solução e estabilidade em ampla faixa de temperatura (0 - 100°C), além de consagrada propriedade reológica de pseudoplastia, passou a ser o segundo biopolímero produzido em escala comercial e o primeiro a ser utilizado amplamente na indústria de alimentos para controlar viscosidade, textura, retenção de aromas, suspensão de sólidos e estabilização de emulsões. Também são empregadas em outras indústrias, como na recuperação de petróleo, impressão em tecidos, como

componentes de pastas de dentes, desodorantes em forma de géis, produtos agrícolas e muitos outros. Atualmente ainda ocupa os primeiros lugares na produção industrial ao lado da dextrana (BeMILLER; WHISTLER, 1996; LO; YANG; MIN, 1997; SUTHERLAND, 1998).

A goma gelana é sintetizada por *Pseudomonas elodea* e produz um gel termorreversível em baixas concentrações (0,75%) quando aquecido e resfriado. É muito utilizado em meios de cultivo como agente geleificante (Gelrite), além disso, recebeu aprovação em 1988 no Japão, e em 1990 nos EUA, para ser utilizado em alimentos como congelados, sorvetes e geléias, e possui grande potencial para concorrer com o ágar na fabricação de confeitos e doces (JANSSON; LINDBERG; SANDFORD, 1983; SUTHERLAND, 1998).

A curdlana é uma glucana β -(1 \rightarrow 3) de cadeia linear produzida por *Alcaligenes faecalis* e *Agrobacterium radiobacter*. Sua principal característica é a formação de géis termicamente irreversíveis que, quando formados em altas temperaturas, não fundem-se abaixo de 140°C. Em relação ao ágar, são muito mais elásticos, mais resistentes à degradação pelo congelamento/descongelamento e podem ser formados numa ampla faixa de pH (3,0 a 9,5). O maior emprego comercial de curdlana é na indústria de confeitos no Japão, e também como filmes comestíveis em combinação com outros polissacarídeos. Seu uso em alimentos ainda é limitado por apresentar efeito adverso ao paladar e devido à forte concorrência do ágar. Possui aplicações potenciais em relação às suas propriedades anti-tumoral e através de digestão enzimática pode originar um açúcar raro como o dissacarídeo laminariobiose (PHILLIPS; LAWFOR, 1983; SUTHERLAND, 1998).

O alginato bacteriano é um polímero linear de estrutura não repetitiva composta por ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, produzido especialmente por *Azobacter vinelandi*. Possui propriedade geleificante que pode ser controlada pela adição de cálcio. Encontra principalmente aplicações nas indústrias têxtil, de alimentos e cervejarias, porém, a forte concorrência dos alginatos sintetizados por algas limitam sua utilização (VARGAS-GARCIA et al., 2002).

Existe um grupo de polímeros denominados comercialmente de Zanflo, constituído por três tipos de gomas, PS-10, PS-21 e PS-53. Estas gomas são produzidas por bactérias do solo como *Erwinia tahitica*. São altamente viscosas em solução e possuem propriedades de resistência e estabilidade muito interessantes para aplicações nas indústrias de tintas e tapetes (COTTREL, 1980).

A celulose bacteriana é um exopolissacarídeo insolúvel em água, produzido principalmente por *Acetobacter xylinum*. Apresenta-se como um agregado de microfibrilas, formando uma película de superfície com elevado grau de pureza, livre de lignina e de outros materiais não celulósicos. Esta celulose possui propriedades como, alta capacidade de retenção de água, permeabilidade ao oxigênio e alta resistência à tensão, que a torna útil para aplicações específicas em pacientes com queimaduras, ulcerações de pele e outras perdas extensivas de tecidos, agindo como substituto temporário da pele e limitando as infecções. Também pode ser empregada em alimentos dietéticos e outros alimentos, devido ao seu alto poder espessante. (SON et al., 2001).

Alguns lactobacilos produzem exopolissacarídeos capazes de desempenhar funções significativas na reologia e textura dos produtos lácteos fermentados, melhorando sua estabilidade e qualidade, portanto, podem ser usados como aditivos naturais em produtos alimentícios (MACEDO et al., 2002).

Muitos outros EPS bacterianos ainda não alcançaram posições de destaque no mercado, porém estão sendo estudados e apresentam potencial para inúmeras aplicações inéditas, dentre eles, podem ser citados como exemplos, as ciclossoforanas que são biopolímeros cíclicos, produzidos por *Rhizobium*, *Agrobacterium* e algumas espécies de *Xanthomonas*, e também o “emulsan” e o “indican” que são EPS lipofílicos com propriedades tensoativas, produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* e *Beijerinckia indica*, respectivamente (SUTHERLAND, 1990; MAUGERI FILHO, 2001).

3.2.3 Principais Exopolissacarídeos produzidos por Fungos e suas Aplicações

Somente por volta de 1960, os fungos produtores de EPS despertaram a atenção dos cientistas que até então, estudavam apenas as bactérias produtoras destes polímeros. Os exopolissacarídeos fúngicos podem ser heteropolissacarídeos ou homopolissacarídeos. Em relação aos heteropolissacarídeos, as informações sobre suas características químicas e propriedades físico-químicas ainda são superficiais e como resultado, são pouco explorados

industrialmente. Os homopolissacarídeos fúngicos podem ser α -glucanas ou β -glucanas (SEVIOUR et al., 1992).

O número de α -glucanas fúngicas citado na literatura é pequeno, sendo que o mais estudado é a pululana, produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*. É um polímero linear, constituído por subunidades de maltotriose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 6) e um pequeno número de maltotetraose com ligações β -(1 \rightarrow 4) (GIBBS; SEVIOUR, 1996). Seu peso molecular e suas propriedades físicas e químicas variam de acordo com as linhagens produtoras selecionadas e as condições de cultivo (LEE et al., 1999). A pululana tem muitas aplicações comerciais na área médica e industrial (GIBBS; SEVIOUR, 1998), apesar da presença freqüente do pigmento de melanina durante sua obtenção. Este problema pode ser solucionado com a utilização de cepas mutantes, incapazes de produzir a melanina, que é um subproduto indesejável (SCHUSTER; WENZIG; MERSMANN, 1993), ou através de descoloração usando carvão ativado (KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003). O principal emprego da pululana é para a obtenção de filmes de revestimento e embalagem de alimentos. É biodegradável, resistente a óleos e gorduras, estável a variações de temperaturas, possui baixa permeabilidade ao oxigênio e é comestível, podendo também ser utilizada como prebiótico para promover seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium* sp. no intestino humano (SUTHERLAND, 1998).

Muitos fungos são produtores de β -glucanas, especialmente aquelas do tipo β -(1 \rightarrow 3). Embora muitas destas glucanas tenham sido descritas, somente algumas delas foram rigorosamente caracterizadas estruturalmente, portanto, sua diversidade química e suas potenciais propriedades funcionais ainda são pouco conhecidas. A grande maioria destas β -glucanas fúngicas estudadas, parecem possuir uma cadeia principal com ligações β -(1 \rightarrow 3) e ramificações laterais unidas por ligações β -(1 \rightarrow 6). A freqüência destas ramificações e o comprimento das cadeias laterais podem variar entre as β -glucanas, porém, elas apresentam em comum, propriedades reológicas interessantes e exibem atividade antitumoral (SCHMID et al., 2001), já discutidas anteriormente.

A escleroglucana é uma glucana β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) amplamente estudada, sendo sintetizada por várias espécies de fungos, principalmente o *Sclerotium glucanicum* e o *Sclerotium rolfsii*. A escleroglucana é solúvel em água, dá origem a soluções altamente viscosas, nas quais estes polímeros adotam uma conformação em tripla-hélice (FALCH et al., 2000). Estas soluções

são pseudoplásticas e possuem alta tolerância a variações de temperatura (20 a 90° C) e pH. Por ser um polímero neutro, sua viscosidade não é afetada por variações nas concentrações salinas; esta característica química é vantajosa sobre outros polissacarídeos polianiônicos, para serem utilizadas na fabricação de produtos agrícolas (SUTHERLAND, 1998). Outra importante aplicação da escleroglucana é na indústria petrolífera para recuperação de óleos (HOLZWARTH, 1985). Em relação as suas propriedades fisiológicas, muitos estudos têm demonstrado que a escleroglucana é estimulante do sistema imunológico, apresentando atividade antineoplásica e antimicrobiana significativamente elevadas, comparada a outras β -glucanas (FARINÃ et al., 1998). Alguns autores relataram sua atividade antiviral durante fases muito precoces da infecção pelos vírus da rubéola e herpes (MARCHETTI et al., 1996; MASTROMARINO et al., 1997).

Outras β -glucanas fúngicas ainda não foram estudadas na mesma extensão da escleroglucana e pululana, portanto, poucas informações estão disponíveis a respeito de suas propriedades químicas e físicas e sua fisiologia de produção (SEVIOUR, 1992). Entretanto, um grande número destes polímeros fúngicos como, a lentinana, são relatadas por suas propriedades comuns, como agentes anti-tumorígenos e imunomoduladores (SUTHERLAND, 1998). Algumas destas β -glucanas apresentam características químicas muito similares à da escleroglucana, as quais incluem a esquizofilana produzida pelo *Schizophyllum commune*, a cinearana pelo *Botrytis cinerea* e a glucana produzida pelo *Claviceps purpúrea* (MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999; SCHMID, 2001). A pestalotana, produzida pelo *Pestalotia* sp, apresenta diferenças por ser mais freqüentemente ramificada com resíduos simples ou oligossacarídeos curtos, ligados à cadeia principal da glucana β -(1 \rightarrow 3) (MISAKI et al., 1984). A epiglucana produzida por *Epicoccum nigrum* apresenta maior semelhança estrutural com a pestalotana e maior freqüência de ramificações do que a escleroglucana (SCHMID, 2001).

3.3 EXOPOLISSACARÍDEO DE *BOTRYOSPHAERIA* SP

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp foi isolado de cancro de eucalipto por Barbosa e colaboradores (1995) e selecionado como ligninolítico, sendo produtor constitutivo de lacases. Estas polifenol oxidases podem ter o nível de produção fortemente aumentado pela

adição do álcool veratrílico como agente indutor (BARBOSA; DEKKER; ST HARDY, 1996). Foram utilizadas a metodologia de planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de lacases, na presença do álcool veratrílico (VASCONCELOS et al., 2000). Estudos adicionais demonstraram que o aumento da aeração interfere positivamente na produção das lacases por este fungo, diminuindo o tempo de produção destas enzimas. Entretanto, também foi observado, pela primeira vez, que o *Botryosphaeria* sp produz um exopolissacarídeo (EPS), capaz de elevar a viscosidade do meio de cultivo, quando foi cultivado em glucose 4 % (p/v) como única fonte de carbono. Através de hidrólise enzimática, empregando-se enzimas comerciais específicas para ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4), na solução do EPS, foi constatado que este polissacarídeo é uma β -glucana (DEKKER; BARBOSA, 2001). Recentemente, foi padronizada uma condição de inóculo do micélio do *Botryosphaeria* sp. para se obter reprodutibilidade dos resultados e determinada uma concentração de glucose, a 5 % (p/v), como sendo a mais adequada para se obter maior concentração do EPS durante 72 horas de cultivo, à temperatura de 28°C (PIGATTO, 2002).

O exopolissacarídeo produzido pelo *Botryosphaeria* sp., foi denominado botriosferana e analisado estruturalmente neste trabalho, constatando-se que possui cadeia principal constituída de unidades glucosídicas β -D-(1 \rightarrow 3) com ramificações em C-6 por resíduos β -D-(1 \rightarrow 6)-glucopiranosídicos e β -D-(1 \rightarrow 6)-gentiobiosídicos (BARBOSA et al., 2003).

3.4 SÍNTESE DE β -GLUCANAS POR FUNGOS

As β -glucanas são os polissacarídeos mais abundantes encontrados em fungos. Estes polímeros constituem uma importante porcentagem da biomassa fúngica, podendo atingir 75% da parede das hifas, principalmente nos basidiomicetos. Além disso, algumas β -glucanas são excretadas para o meio extracelular e formam o principal componente de revestimento ao redor do micélio. Estes exopolissacarídeos podem desempenhar diversas funções quando o fungo cresce sobre o seu substrato natural, ou são parcialmente dissolvidos no meio de cultivo quando o fungo cresce em meio líquido (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

As funções específicas das β -glucanas na fisiologia, no metabolismo e na morfogênese dos fungos ainda não estão completamente esclarecidas, entretanto, o principal papel destes polímeros é estrutural, onde contribuem para a manutenção da rigidez e integridade da parede celular (WILLIAMS, 1997). Muitas outras funções têm sido sugeridas para estes EPS, como a proteção das hifas contra a desidratação, a sua participação na interação fungo-hospedeiro e também, sua mobilização como reserva alimentar para os fungos. Alguns estudos realizados com fungos causadores de podridão branca em madeira, como o *Phanaerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata*, sugerem o envolvimento dos exopolissacarídeos na imobilização das enzimas fúngicas (peroxidases e lacases) sobre seus substratos ligninocelulósicos. Estes EPS também podem estar relacionados com a degradação de lignina, atuando como fonte indireta de peróxido de hidrogênio (GUTIÉRREZ et al., 1996; MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999; KRCCMAR et al., 1999; PYROG, 2001). O peróxido de hidrogênio é um componente essencial para as reações que envolvem enzimas ligninolíticas e é derivado principalmente da oxidação de carboidratos (BES et al., 1987).

A síntese de β -glucanas em fungos necessita de várias etapas, que envolvem reações de iniciação, alongamento da cadeia e ramificação, das quais a mais estudada é o alongamento. Esta reação é catalisada pela enzima glucana β -(1 \rightarrow 3)-sintetase (RUIZ-HERRERA, 1991). Esta enzima tem sido foco de intensivos estudos, devido à sua importante participação na síntese dos exopolissacarídeos de interesse comercial, como também na síntese da parede celular de muitos fungos, inclusive daqueles responsáveis por doenças (micoses) em humanos, como exemplos, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Estes fungos produzem paredes celulares muito ricas em glucanas β -(1 \rightarrow 3). Em tais estudos, foram verificados que as glucanas β -(1 \rightarrow 3)-sintetases são complexos enzimáticos associados à membrana e usam UDP-glucose como substrato doador de resíduos glucosil. A reação se processa, adicionando-se um mol de glucose para cada mol de UDP-glucose hidrolisado, resultando no aumento do comprimento da cadeia linear. A regulação da síntese de glucanas β -(1 \rightarrow 3) está relacionada com uma fosforilação dependente de ATP combinada com um nucleotídeo de guanosina (DOUGLAS, 2001). As propriedades das glucanas β -(1 \rightarrow 3)-sintetases são extremamente variáveis dependendo da espécie fúngica e do seu estágio de desenvolvimento. A elucidação do mecanismo de produção desses polímeros permite o entendimento do processo de síntese da parede celular, do crescimento e morfogênese da célula fúngica e também, é

importante para o desenvolvimento de drogas antifúngicas específicas (RUIZ-HERRERA, 1991), além de contribuir para a otimização dos processos de produção destes EPS de aplicações comerciais. Os avanços das pesquisas nesta área têm ocorrido graças à disponibilidade de inibidores específicos da reação enzimática que produz glucana β -(1 \rightarrow 3). Alguns destes inibidores são naturais e pertencem as classes dos lipopeptídeos, glicolipídeos e terpenóides. Eles têm sido utilizados como ferramentas para analisar a biologia da glucana β (1 \rightarrow 3)-sintetase, e como fonte de desenvolvimento de derivados semi-sintéticos usados clinicamente no tratamento de doenças fúngicas em humanos (DOUGLAS, 2001).

3.5 FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

A disponibilidade de informações sobre as propriedades e fisiologia de produção das glucanas β -(1 \rightarrow 3) fúngicas ainda é baixa, quando comparada aos EPS bacterianos que têm sido estudados desde muito tempo por um grande número de pesquisadores (SEVIOUR et al., 1992).

A composição química e o grau de polimerização (massa molecular) dos EPS são dependentes das condições nutricionais e ambientais do meio de cultivo e do microrganismo selecionado para a sua produção (VARGAS-GARCIA et al., 2002).

A manipulação da composição de alguns EPS, através de modificações no meio de crescimento, é um mecanismo pelo qual as propriedades do polímero podem ser planejadas de acordo com a aplicação desejada (MARGARITS; PACE, 1985).

A quantidade de biomassa fúngica formada não é sempre proporcional aos rendimentos em exopolissacarídeos. Vários fatores podem interferir isoladamente ou simultaneamente durante a produção dos exopolissacarídeos, como por exemplo, fonte de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, agitação, aeração, microelementos, tipo de fermentador e tempo de cultivo (KANG; COTTRELL, 1979; SEVIOUR et al., 1992; MAUGERI FILHO, 2001).

Muitas pesquisas relatam diversas fontes de carbono para produção de EPS por fungos. Entre as mais utilizadas estão a glucose e a sacarose, as quais proporcionam os melhores rendimentos, além da frutose, maltose, sorbitol, inositol, inulina, amido, e também alguns produtos de menor valor, considerados resíduos agroindustriais como lactose, melão e outros, cujos rendimentos em EPS são variáveis. Geralmente, se a fonte de carbono pode ser metabolizada pelo fungo, é possível sua utilização para a produção de exopolissacarídeo, porém, as quantidades de biomassa fúngica e de EPS produzidos são independentes e geralmente não ocorrem na mesma proporção. Entretanto, alguns fungos possuem limitações quanto ao uso de certas fontes de carbono, devido à incapacidade de sintetizar determinadas enzimas hidrolíticas. Alguns estudos relatam a utilização de culturas mistas durante a produção de EPS, como um recurso para aumentar a disponibilidade de alguns substratos como lactose e inulina, e melhorar os rendimentos na produção de exopolissacarídeos como pululana (SEVIOUR et al., 1992). Também podem ser citados: o de amido de milho totalmente hidrolisado, resultando em excelente produção de EPS por *Botryosphaeria rhodina* (SELBMANN et al., 2002) e resíduos de amido de batata hidrolizado, resultando em rendimentos satisfatórios na produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* (BARNETT et al., 1999). Muitos autores avaliaram diferentes concentrações (de 1,5 a 15%) das fontes de carbono citadas acima e a maioria obteve os melhores rendimentos na produção de EPS em concentrações que variaram de 3 a 5% (GRIGOROVA; PAVLOVA; PANCHEV, 1999; MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999). Concentrações elevadas de fonte de carbono afetam a eficiência da sua conversão em polissacarídeo, através de regulação catabólica exercida sobre as enzimas envolvidas na síntese do EPS. Por exemplo, a produção de exopolissacarídeo por *Tremella mesenterica* decresce com o aumento na concentração inicial de glucose; entretanto, os rendimentos podem ser aumentados usando fermentação em batelada alimentada (De BAETS, et al., 2002).

Embora a fonte de nitrogênio seja necessária para o crescimento celular e para a síntese de enzimas envolvidas na formação dos polissacarídeos, o excesso de nitrogênio no meio de cultivo, geralmente reduz a produção de exopolissacarídeos e aumenta a produção de biomassa fúngica (KANG; COTTRELL, 1979; BES et al., 1987). Além disso, o tipo de composto nitrogenado utilizado, também exerce seu efeito regulatório na produção dos EPS. A maioria dos estudos relatam uma intensa inibição na síntese de EPS pelo íon NH_4^+ , quando comparadas a outras fontes de nitrogênio orgânico (SEVIOUR et al., 1992; FARIÑA et al., 1998).

Os outros fatores interferentes na produção de EPS fúngicos são menos estudados e, às vezes, as pesquisas revelam divergências nos resultados. Isto pode ser atribuído à dificuldade de distinção entre os efeitos próprios de cada variável, as quais podem interagir entre si durante a síntese das β -glucanas, dificultando as conclusões dos trabalhos. Além disso, cada cepa fúngica tem características individuais e pode responder de forma distinta a cada um destes fatores. Por exemplo, alguns estudos avaliaram a influência da aeração, através da transferência de altas taxas de oxigênio para o meio, durante a produção de pululana, e os resultados mostraram redução, aumento ou até nenhuma alteração na sua quantidade produzida, dependendo da cepa utilizada no cultivo. Para a maioria dos fungos, os estudos relatam que um alto suprimento inicial de oxigênio no cultivo resulta em aumento da biomassa fúngica. À medida que ocorre alteração da viscosidade do meio, como uma consequência do aumento da concentração celular, das mudanças na morfologia fúngica e do acúmulo de produtos extracelulares, também ocorre a limitação de oxigênio, e o fungo responde através da diminuição do crescimento celular e aumento da síntese de exopolissacarídeos (SEVIOUR et al., 1992; GIBBS; SEVIOUR, 1996; TANG; ZHONG, 2003). Em relação às interferências do pH sobre os rendimentos em EPS fúngicos, as pesquisas revelam resultados variáveis e dependentes de outros fatores como, o tipo de fermentador utilizado, o estágio de desenvolvimento do fungo, além dos níveis e da fonte de nitrogênio presente no meio. As maiores quantidades de β -glucanas fúngicas foram obtidas em pH entre 4,0 e 5,5 (KANG; COTTRELL, 1979; MARGARITS; PACE, 1985; SEVIOR et al., 1992).

O tempo de cultivo é outro parâmetro que deve ser respeitado quando se deseja altos rendimentos em exopolissacarídeos fúngicos. A massa molecular do polímero exerce influência direta sobre sua viscosidade. Um decréscimo na viscosidade do meio de cultivo em estágios avançados da fermentação pode ser atribuído à produção de enzimas (glucanases) capazes de degradar o próprio polímero, diminuindo seu rendimento (SEVIOUR et al., 1992; LEE et al., 1999).

3.6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPS FÚNGICOS

Os exopolissacarídeos fúngicos podem ser produzidos juntamente com outros metabólitos, em um meio de cultivo constituído por diversos nutrientes, formando uma mistura heterogênea. Para investigar as propriedades e reações destes EPS, é primeiramente necessário isolar o polissacarídeo desejado e purificá-lo até homogeneidade. Não existe uma medida para a determinação da pureza que possa ser aplicada a todos os polissacarídeos. Geralmente, o EPS é considerado puro quando isolado por dois procedimentos diferentes e as preparações resultantes apresentarem as mesmas propriedades químicas, físicas e biológicas. Após a purificação adequada dos exopolissacarídeos, deve ser feita a elucidação completa da estrutura molecular do polímero, através da utilização de um conjunto de técnicas diferentes, que fornecem resultados complementares. Estas técnicas permitem: a determinação do tipo de constituintes monossacarídeos, a configuração D ou L dos resíduos, o número de resíduos por molécula, a posição das ligações glicosídicas entre os resíduos, a seqüência dos resíduos nas cadeias e a configuração anomérica das ligações glicosídicas (PAZUR, 1994).

O número de exopolissacarídeos fúngicos com estrutura química totalmente elucidada ainda é pequeno, quando comparado com aqueles produzidos por bactérias. Os EPS fúngicos mais estudados são pululana e escleroglucana, além de outros menos conhecidos. Muitos deles apresentam caracterização estrutural incompleta, freqüentemente restrita à composição em monossacarídeos e à configuração das ligações glicosídicas; conseqüentemente, o tipo de ramificação não é conhecido (SEVIOUR et al., 1992). Atualmente, há um crescente interesse por estes EPS devido ao grande número de aplicações possíveis, sugeridas ou concretizadas, nas mais diversificadas áreas. Por exemplo, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) fúngicas exibem uma variedade de atividades biológicas e imuno-farmacológicas, as quais são dependentes da estrutura do polímero, como a solubilidade em água, a massa molecular, o grau de ramificação e a conformação; sendo assim, é necessária uma caracterização química completa do polímero (YADOMAE, 2000). Outro motivo que leva ao aumento do interesse pela caracterização estrutural completa dos EPS fúngicos, é entender a verdadeira participação destas macromoléculas no metabolismo do fungo, como por exemplo, na degradação de lignina pelos fungos ligninolíticos (KRCMAR, 1999; PYROG, 2001).

A pululana é um homopolissacarídeo extracelular produzido por *Aureobasidium pullulans*. Este polímero é constituído de unidades de maltotriose e maltotetraose com ligações α -(1→6) e α -(1→4). A alternância regular destas ligações resulta em duas propriedades distintas, flexibilidade estrutural e melhoria da solubilidade (LEE et al., 1999). A proporção das ligações α -(1→6) e α -(1→4) e as propriedades físicas desta α -glucana podem variar de acordo com a cepa utilizada para a produção (SEVIOUR et al., 1992; SHINGEL, 2004). Suas aplicações industriais têm sido revisadas por Deshpande e colaboradores (1992) (apud BARNETT et al., 1999), enquanto sua estrutura e biossíntese têm sido revisadas por Shingel (2004).

Um exopolissacarídeo ácido foi isolado de um cultivo de *Aureobasidium pullulans*. Utilizando-se as técnicas de espectroscopia e cromatografia, o polímero foi identificado como uma β -D-glucana contendo uma cadeia principal de unidades de glucopiranosídicas (1→3) ligadas e substituídas em O-6. A proporção de unidades na cadeia principal para unidades na cadeia lateral encontrada foi de 1,4: 1. O caráter iônico deste polímero foi atribuído à presença de resíduos de malato ligados por ligações éster e o grau de substituição foi estimado como muito baixo (0,05) (NAVARINI et al., 1996).

Um polissacarídeo extracelular ácido produzido pelo fungo *Rhodotorula glutinis* com 85% de açúcares neutros e 15% de ácido urônico, teve sua composição em açúcares neutros determinada, após hidrólise ácida seguida por cromatografia gasosa. O resultado revelou manose, fucose, glucose e galactose na proporção de 6,7: 0,2: 0,1: 0,1. A massa molecular do EPS purificado foi estimada em 1,0 - 3,8 x 10⁵ Da e a distribuição da massa molecular foi muito homogênea, com índice de polidispersividade igual a 1,32 (CHO; CHAE; KIM, 2001).

A escleroglucana sintetizada por várias espécies de fungos, principalmente o *Sclerotium glucanicum* e o *Sclerotim rolfsii* é constituída por unidades glucopiranosídicas β -(1→3) substituídas, regularmente ou randomicamente, em C-6 por resíduos glucopiranosídicos. A escleroglucana produzida pelo *Sclerotim rolfsii* com massa molecular de aproximadamente 10⁵ Da possui substituições em C-6 a cada três unidades de glucose da cadeia principal. Entretanto, a escleroglucana sintetizada pelo *Sclerotium glucanicum* com massa molecular menor, de cerca de 18.000 Da, apresenta ramificações a cada quatro ou seis resíduos da cadeia principal. Estas estruturas foram confirmadas por r.m.n. - ¹³C. A diversidade nas ramificações e na massa

molecular pode afetar significativamente a solubilidade dos EPS (SEVIOUR et al., 1992; SUTHERLAND, 1998).

As glucanas fúngicas que apresentam características químicas muito semelhantes à escleroglucana incluem a esquizofilana produzida pelo *Schizophyllum commune*, a cinearana pelo *Botrytis cinerea* e a glucana produzida pelo *Claviceps purpúrea*. Estas moléculas possuem uma cadeia principal com unidades β -(1→3)-glucopiranosídicas e uma ramificação β -(1→6)-glucopiranosídica a cada três resíduos da cadeia principal. A pestalotana, produzida pelo *Pestalotia* sp, é mais ramificada, contém resíduos β -(1→6)-glucopiranosídicos e também, em menor frequência, resíduos curtos β -(1→6)-oligossacarídicos, em média, a cada três de cinco resíduos da cadeia principal da glucana β -(1→3) (MISAKI et al., 1984).

Um exopolissacarídeo, denominado botriosferana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp., foi recentemente caracterizado. O EPS precipitado por etanol e purificado por cromatografia de filtração em gel foi submetido à hidrólise ácida para determinação dos seus constituintes monossacarídicos. Os resultados das análises por cromatografia de troca iônica de alta pressão revelaram 98% de glucose. Os espectros de FTIR e r.m.n. - ^{13}C mostraram que todas as ligações glicosídicas apresentavam configuração β . Os resultados das análises de metilação e degradação de Smith indicaram que o botriosferana é uma glucana β -D-(1→3) com cerca de 22% de ramificações em C-6. Após hidrólise ácida parcial, foi demonstrado que as ramificações consistem de resíduos glucopiranosídicos e gentiobiosídicos β -(1→6) ligados, presentes a cada cinco resíduos da cadeia principal (BARBOSA et al., 2003).

Um estudo comparativo sobre as estruturas químicas das epiglucanas (polissacarídeos extracelulares) produzidas por três cepas diferentes do micro fungo *Epicoccum nigrum*, foi efetuado por Schmid e colaboradores (2001). Os dados das análises por espectroscopia de infra-vermelho, r.m.n. - ^{13}C e digestão enzimática específica mostraram que todas as ligações glicosídicas possuíam configuração β . Além disso, os dados de metilação, hidrólise e cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa (c.l.g.-e.m.) indicaram que as epiglucanas eram glucanas β -D-(1→3; 1→6) altamente ramificadas. Os resultados obtidos mostraram discretas variações estruturais entre as três cepas estudadas.

Uma glucana produzida pelo fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, causador da podridão branca em madeira, foi isolada através de centrifugação e precipitação etanólica. Após hidrólise ácida do polissacarídeo, os resíduos foram analisados por

c.l.g.-e.m., revelando 92% de glucose e 8% de arabinose. As análises de metilação-hidrólise-c.l.g.-e.m., mostraram os picos correspondentes a 2,3,4,6-tetra- (38,5%); 2,4,6-tri- (24,8%); 2,3,4-tri- (11,5%) e 2,4-di-*O*-metil-D-glucitol (25,2%). Estes resultados indicaram que a glucana era constituída de uma cadeia principal com ligações (1→3) e substituições em *O*-6, aproximadamente a cada dois resíduos. As ramificações consistiam de resíduos glucopiranosídicos e gentiobiosídicos (1→6)-ligados em uma proporção de 4,4 para 1. Os espectros da análise por r.m.n. - ¹³C mostraram que todos os resíduos glucopiranosídicos possuem configuração β. O sinal em δ 104,2 foi atribuído ao C-1; os sinais δ 87,8 e 87,3 corresponderam aos C-3 substituídos e aqueles em δ 62,3 e 62,1 se referiram ao C-6 livre (BES et al., 1987).

O polissacarídeo extracelular produzido pelo fungo ligninolítico *Phlebia radiata* foi caracterizado estruturalmente. Após desproteínização por tripsina, a fração polissacarídica foi submetida à hidrólise ácida e analisada por cromatografia gasosa (c.l.g.-e.m.). Os resultados indicaram uma proporção relativa dos seguintes carboidratos: glucose (62%); galactose (16%); manose (13%); xilose (4%) e fucose (5%). Os espectros de FTIR foram realizados com material extracelular bruto e mostraram claramente bandas em 890 cm⁻¹ e em 1535 cm⁻¹, indicando respectivamente, ligação β entre os resíduos e presença de proteínas. Estes resultados demonstraram a presença de uma glucana contaminada com uma glicoproteína e sugeriram a formação de um complexo com a função de revestimento extracelular ao redor das hifas. As análises de metilação pelo método de Hakomori (HAKOMORI, 1964), seguida de hidrólise e c.l.g.-e.m. revelaram resíduos 2,3,4,6-tetra-, 2,4,6-tri- e 2,4-di-*O*-metil glucopiranosídicos em uma proporção molar relativa de 30:48:22, respectivamente. Tais resultados indicaram a presença de uma cadeia principal com resíduos glucopiranosídicos ligados em C-3, dos quais dois terços apresentavam ramificações em C-6. A confirmação do alto grau de ramificação da cadeia principal foi feita por comparação da intensidade dos sinais em δ 61,03 e 70,08, característicos de C-6 não-substituídos e substituídos por resíduos glucopiranosídicos, respectivamente. Os outros sinais de ressonância foram compatíveis com uma β-D-glucana. O sinal em 102,83 ppm para o C-1, 86,38 ppm para C-3 envolvido na ligação glicosídica β, além dos sinais em 76,53 ppm (C-5), 73,37 ppm (C-2) e 68,32 ppm (C-4) (KRCMAR et al., 1999).

Gutiérrez, Prieto e Martínez (1996), estudaram e compararam uma classe de exopolissacarídeos produzidos em meios de cultivo líquidos por fungos do gênero *Pleurotus*, os

quais mostraram composições e estruturas similares. Após precipitação etanólica e diálise contra água, os polissacarídeos foram submetidos à cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B. Os resultados revelaram a presença de dois componentes: uma fração menor, glicoprotéica e solúvel em água, e outra fração maior com baixa solubilidade e elevada massa molecular, analisada em detalhes. A hidrólise ácida e as análises de configuração deste material mostraram D-glucose como o principal monossacarídeo (95%), com menores proporções de D-manose (4,5%) e D-galactose (0,5%). Os espectros de FTIR indicaram bandas características de glucanas nas regiões 1000-1100 cm^{-1} e uma banda em 890 cm^{-1} atribuída à configuração β das ligações glicosídicas. Os resultados da metilação mostraram que os polímeros eram glucanas β -D-(1 \rightarrow 3) contendo cerca de 25% do total das unidades ramificadas em C-6. Tais resultados foram confirmados pela intensidade de sinais atribuídos aos C-3 e C-6, livres e substituídos, nos espectros de r.m.n. - ^{13}C . Análises complementares desses polissacarídeos como degradação de Smith e acetólise, indicaram moléculas lineares, resultantes da eliminação das ramificações. Os resultados acima indicaram que as ramificações em C-6 eram constituídas por resíduos simples de glucose, a cada duas ou três unidades da cadeia principal da glucana β -D-(1 \rightarrow 3).

Devido às grandes mudanças climáticas na Terra observadas nos últimos anos, alguns estudos têm por finalidade elucidar as diferentes estratégias de adaptação dos microrganismos e sua habilidade de sobrevivência em ambientes, cujas condições climáticas são altamente estressantes. Neste contexto, um exopolissacarídeo produzido pelo fungo filamentoso *Phoma herbarum*, foi isolado do solo da Antártida e estudado. O polissacarídeo foi purificado por precipitação etanólica e cromatografia de filtração em gel (Sephacryl HR-500). A composição em monossacarídeos foi analisada por cromatografias em camada delgada e líquido-gasosa, revelando apenas a presença de glucose. A massa molecular do EPS, determinada por análise de varredura por laser (LALLS) foi de $7,4 \times 10^6$ Da. Os resultados da metilação revelaram a presença de um polímero constituído por uma cadeia principal de resíduos glucopiranosídicos β -(1 \rightarrow 3) com ramificação em C-6. A proporção relativa entre os resíduos tetra-, tri- e di-*O*-metilados foi 1,3:1:1,4. Este resultado caracteriza um polímero mais ramificado quando comparado a outras glucanas como escleroglucana e esquizofilana. EPS altamente ramificados, geralmente são considerados um fator positivo na estimulação do sistema imunológico. Uma análise por hidrólise enzimática com β -(1 \rightarrow 3)-glicosidase, seguida por cromatografia em camada delgada comparou as estruturas deste EPS com a escleroglucana. Os cromatogramas de ambas as

amostras mostraram resíduos glucopiranosídicos e gentiobiosídicos, com intensidades relativas diferentes, indicando que cada amostra possuía grau de ramificação distinto. Este estudo também revelou a influência significativa das alterações climáticas no aumento da produção do exopolissacarídeo do *P.herbarum*, sugerindo a participação deste polímero na adaptação do fungo às condições microclimáticas do solo do continente Antártico (SELBMANN et al., 2002).

Observações citológicas têm mostrado a presença de material fibrilar contendo polissacarídeo e glicoproteínas na interação dos fungos (ectomycorrhiza) com as células das raízes do hospedeiro. Alguns EPS neutros foram produzidos pelo fungo *Thelephora terrestris*. Os exopolissacarídeos foram preparados por precipitação etanólica e fracionados em dois componentes por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose. A fração neutra foi refractionada em cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B, resultando em três picos: NeP1, NeP2 e NeP3. O primeiro pico foi filtrado através de uma membrana de exclusão e um dos polissacarídeos obtidos foi submetido a metilação e análises espectroscópicas por r.m.n. de ^1H , ^{13}C e 2D. Tais análises mostraram uma cadeia principal constituída por unidades de manose α -(1 \rightarrow 6) ligadas em O-2 por diferentes cadeias laterais contendo resíduos de α -fucose, β -xilose e β -galactose em uma proporção molar de 50:29:11:10, respectivamente. Este EPS quando analisado por cromatografia de alta pressão de exclusão por tamanho acoplada a varredura por laser (HPSEC-MALLS), mostrou um componente principal de 15,0 KDa. Os picos NeP2 e NeP3 foram caracterizados como uma glucana β -(1 \rightarrow 6) (pustulana) e uma glucana β -(1 \rightarrow 3), respectivamente (OSAKU et al., 2002).

Kim e colaboradores (2003), caracterizaram parcialmente os polissacarídeos do fungo entomopatogênico *Cordyceps militaris*. Quatro grupos destes EPS (designados Fr-I, Fr-II, Fr-III e Fr-IV) foram obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e suas características moleculares foram examinadas através de análise por varredura com laser (MALLS) e sistema de detecção por índice de refração. A massa molecular destas frações foram $2,262 \times 10^6$, $3,348 \times 10^5$, $1,049 \times 10^5$ e $5,059 \times 10^4$ g/mol, respectivamente e a análise SEC/MALLS revelou características próprias de cada fração como, a configuração molecular. Os quatro EPS mostraram um índice muito baixo de polidispersividade, variando de 1,00 a 1,18.

Três grupos de EPS (Fr-I, Fr-II e Fr-III), produzidos pelo fungo *Phellinus linteus* foram obtidos por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B e analisados diretamente usando SEC/MALLS. Foram reveladas que todas as frações de EPS eram

constituídas principalmente por manose, galactose e glucose. A massa molecular de cada fração do EPS foi de aproximadamente 433 KDa, 31 KDa e 13 KDa, respectivamente. De acordo com estas análises, foi atribuída à fração Fr-I uma conformação esférica e a Fr-II um espiral ao acaso. (HWANG et al., 2003).

Apesar das dificuldades encontradas no processo de extração, para obtenção dos componentes dos esporos do *Ganoderma lucidum*, estes compostos têm atraído muita atenção na medicina chinesa por suas atividades biológicas diversificadas (ZHANG et al., 1994). Um polissacarídeo foi isolado destes esporos por Bao, Fang e Li (2001) através de técnicas como extração a quente, desproteinização e precipitação etanólica. Após purificação por cromatografias de troca-iônica (DEAE-celulose) e de filtração em gel (Sephacryl S-300 HR), a massa molecular do polímero foi determinada por cromatografia líquida de alta pressão com coluna de filtração em gel (HPSEC) como $1,26 \times 10^5$ g/mol. O estudo da composição monossacarídica indicou apenas glucose e o espectro de infravermelho mostrou uma banda em 890 cm^{-1} característica do anômero β de glucopiranosose. As análises por r.m.n. de ^1H e ^{13}C mostraram sinais em δ 4,60 e δ 104,7 atribuídos, respectivamente, aos carbonos anoméricos da β -glucana. Os demais sinais em δ 86,3 (C-3), δ 81,0 (C-4), δ 70,8 e δ 69,5 (C-6 substituído) indicaram resíduos β -D-glucopiranosídicos (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) substituídos. O deslocamento químico em 62,8 ppm foi atribuído ao C-6 livre. As análises de metilação revelaram os componentes 2,3,4,6-tetra-, 2,4,6-tri-, 2,3,6-tri-, 2,3,4-tri-, 2,4-di- e 2,3-di-*O*-metil-glucitol. Devido à complexidade da estrutura da glucana, procedimentos de despolimerização parcial foram efetuados, tais como hidrólise ácida parcial, degradação de Smith seguida de hidrólise branda e acetólise. Os resultados encontrados indicaram que o polímero tratava-se de uma cadeia principal constituída de unidades glucopiranosídicas (1 \rightarrow 6) ligadas e substituídas em C-3 ou C-4 por resíduos mono-, di- ou trissacarídicos (BAO; FANG; LI, 2001).

Todas estas diferenças em composição, tipos de ligações glicosídicas, massa molecular e grau de ramificação dos polissacarídeos influenciam as estruturas secundárias e terciárias das cadeias simples e sua conformação macromolecular, as quais determinam as propriedades físicas do polímero como, sua solubilidade em água, formação de gel e outras. Estas propriedades estão relacionadas às funções estruturais ou fisiológicas desempenhadas pelos exopolissacarídeos (SAITÔ; YOKOI; YOSHIOKA, 1989), além de possibilitar suas aplicações comerciais em áreas amplamente diversificadas como na indústria de alimentos, na indústria

farmacêutica e de cosméticos, na indústria petrolífera para recuperação de óleos e outras.(SELBMANN et al., 2002). A liberação destas moléculas para utilização, especialmente nas áreas de alimentos e medicamentos, é autorizada por órgãos competentes, apenas após o estudo completo da estrutura química e das atividades biológicas do polissacarídeo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo produtor do EPS em estudo foi o ascomiceto *Botryosphaeria* sp isolado de cancro de eucalipto por Barbosa, Dekker e St Hardy (1996).

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo dos meios de cultivo, das soluções e experimentos foram de grau analítico, obtidos da Merck, Fluka ou Sigma.

Os géis utilizados nas cromatografias foram Sepharose CL-4B, DEAE-Sepharose Fast Flow e Sephadex G-15 da Pharmacia.

As diálises foram executadas em tubos de diálise com limite de exclusão de 10.000 – 12.000 daltons, em sistema fechado, sob agitação, à temperatura de 4 °C ou em sistema aberto à temperatura de 21 °C.

O melão de cana-de-açúcar foi gentilmente doado pela COROL – Rolândia – PR.

4.1.3 Equipamentos

Autoclave vertical, modelo 103, FABBE-PRIMAR

Estufa bacteriológica, modelo 002, CB FANEM

Incubadores orbitais termostatizados, modelo MA 240, TECNAL e MARCONI

Balanças Analíticas Mettler Toledo AB204, MICRONAL; e BG 200,

GEHAKA

Balanças Semi-analíticas BG-2000 e BG 440, GEHAKA

Colorímetro B-640, MICRONAL

Espectrofotômetros UV-1601, SHIMADZU; METROLAB 1700 UV-Visível

Liofilizador E-C Modulyo Model Weight, EDWARDS

Rotavapor Waterbath B-480, BÜCHI

Deionizador Water Pro PS, LABCONCO

Destilador, QUIMIS

Estufa, QUIMIS

Bloco de Aquecimento para Hidrólise Digi Block, LABORATORY DEVICES
INC

Pipetas Automáticas Pipetman, GILSON

Coletor de Frações Frac-100, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

Bomba Peristáltica Pump P-1, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

Bomba de Vácuo Dia Pump, FANEM

Cromatógrafo Líquido de Troca Iônica (HPAEC) com Detector Eletroquímico
Modelo ED 40, Bomba Gradiente Modelo GP40, integrador modelo 4600;

DIONEX

Centrífuga a Vácuo DNA-Plus, HETO

Microcentrífuga, BECKMAN

Centrífuga, DAMON/ICE DIVISION

Centrífuga modelo 206 R, EXCELSA

Banho-maria, FANEM

pH-metro B 474, MICRONAL

Agitador-Aquecedor Mod. 258, FANEM
 Agitador de Tubos AP 56, PHOENIX
 Ultrassom, SONICAR
 Espectrômetro modelo Vector 22, BRUKER
 Espectrômetro modelo DRX-400, BRUKER

4.2 MÉTODOS GERAIS

4.2.1 Meios de Cultivo

4.2.1.1 Meio mínimo de Vogel (1956)

| | |
|--|--------|
| Na ₃ citrato 5.H ₂ O | 150 g |
| KH ₂ PO ₄ anidro | 250 g |
| NH ₄ NO ₃ anidro | 100 g |
| MgSO ₄ 7.H ₂ O | 10 g |
| CaCl ₂ 2.H ₂ O | 5 g |
| Solução Elementos Traços | 5 mL |
| Solução de Biotina | 2,5 mL |

O volume final foi acertado para 1 litro. Para ser usado, este meio foi diluído 50 vezes em água destilada. O pH foi corrigido para 5,8 com ácido fosfórico ou sulfato de amônia.

| | |
|--|--------|
| Solução de Elementos Traços | |
| Ácido cítrico 1. H ₂ O | 5 g |
| ZnSO ₄ 7. H ₂ O | 5 g |
| Fe (NH ₄)(SO ₄) ₂ 6. H ₂ O | 1 g |
| CuSO ₄ 5. H ₂ O | 0,25 g |

| | |
|--|--------|
| MnSO ₄ 1. H ₂ O | 0,25 g |
| H ₃ BO ₃ anidro | 0,05 g |
| Na ₂ MoO ₄ 2. H ₂ O | 0,05 g |

O volume final da solução de elementos traços foi completado para 100 mL. A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina (Merck) em 50 mL de água destilada.

4.2.1.2 Meio Batata-ágar-dextrose (BDA)

| | |
|----------------|---------|
| Batata | 200 g |
| Dextrose | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Água destilada | 1000 mL |

4.2.2 Manutenção do Microrganismo

O fungo *Botryosphaeria* sp foi mantido em BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4 °C, com repiques trimestrais.

4.2.3 Preparo do Inóculo do *Botryosphaeria* sp

Para o preparo do inóculo, o fungo foi transferido para o meio de sólido contendo meio mínimo de sais de Vogel (1/50) (VOGEL, 1956), ágar a 2 % (p/v) e glucose a 1 % (p/v) como fonte de carbono. As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 ± 2° C em estufa bacteriológica. Pequenas porções de hifas foram transferidas para dois frascos de Erlenmeyer

(125 mL) contendo 25 mL de meio mínimo de Vogel, com 0,5 % (p/v) de glucose. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 180 rpm, a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 48 horas. Em seguida, os micélios foram transferidos, assepticamente, para um homogeneizador previamente esterilizado e então, homogeneizados à velocidade máxima durante 30 segundos. O homogeinato foi centrifugado durante 10 minutos a $7000 \times g$, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em uma solução de salina fisiológica estéril. Em seguida, a referida solução foi diluída até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

4.2.4 Avaliação de diferentes Fontes de Carbono na produção de Exopolissacarídeo pelo *Botryosphaeria sp*

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 ml de meio mínimo de Vogel (1956) (1/50) e as fontes de carbono: glucose, frutose, manose, galactose, sacarose, sacarose comercial, lactose, manitol, sorbitol e melaço de cana, separadamente, na concentração de 5 % (p/v). Cada frasco foi inoculado com 4 mL do homogeinato de micélios, conforme descrito no item 4.2.3, de acordo com a padronização feita por Pigatto (2002). Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm em temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 72 horas. Para cada fonte de carbono em estudo, os cultivos foram realizados em quatro replicatas.

4.2.5 Produção do Exopolissacarídeo pelo *Botryosphaeria sp* em Glucose como única Fonte de Carbono, para a Caracterização Estrutural

Os cultivos foram desenvolvidos em quatro replicatas, em frascos de Erlenmeyer de 2000 mL contendo 400 mL de meio mínimo de Vogel (1956) (1/50) e 5 % (p/v) de glucose. Cada frasco foi inoculado com 16 mL de solução do homogeinato de células, previamente descrito no item 4.2.3. Os frascos foram agitados a 180 rpm e mantidos a $28 \pm 2^\circ \text{C}$

durante 72 horas. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 7000xg por 10 minutos a 4^o C. Os sobrenadantes foram coletados (em banho de gelo) e dialisados exaustivamente contra água deionizada. Em seguida, foram tratados com 4 volumes de etanol absoluto, previamente gelado a 4 °C, para precipitar o exopolissacarídeo. Depois de mantidos no mínimo por duas horas na câmara fria a 4 °C, os precipitados de EPS foram então dialisados exaustivamente contra água deionizada, liofilizados e utilizados para análises de caracterização estrutural.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da Biomassa Fúngica

As biomassas fúngicas, obtidas em cada uma das fontes de carbono foram lavadas por duas vezes com água destilada e determinadas por gravimetria, através de secagem em estufa a 70° C até peso constante, subtraindo-se o peso seco do inóculo previamente determinado.

4.3.2 Quantificação dos Polissacarídeos produzidos pelo *Botryosphaeria sp* em diferentes Fontes de Carbono

Os cultivos foram desenvolvidos conforme descrito no item 4.2.4 e 50 mL do sobrenadantes de cada frasco foram dialisados, com sucessivas frações de água deionizada, durante 48 horas. Em seguida foram precipitados com 4 volumes de etanol. Cada precipitado foi filtrado, separadamente, em funil de Büchner, em papel de filtro Whatman previamente seco em estufa e pré-tarado. Os exopolissacarídeos foram determinados por gravimetria, após secagem em estufa a 70^o C, até peso constante.

4.3.3 Determinação dos Açúcares redutores – Método de Somogyi-Nelson

Os açúcares redutores dos sobrenadantes de cada cultivo, foram determinados pelo Método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Neste método, os açúcares redutores reduzem o reativo cupro-alcalino de Somogyi formando óxido cuproso, que na presença do reativo arseno-molibdico de Nelson forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável.

Reativos: reativo arseno-molibdico de Nelson (NELSON, 1944) e reativo de Somogyi (SOMOGYI, 1945).

Procedimento: a 0,5 mL da solução contendo de 10 a 80 µg de açúcares redutores foi acrescentado 0,5 mL do reativo de Somogyi. Os tubos foram cobertos com pérolas de vidro para evitar a evaporação do solvente. Após resfriamento, foram adicionados 0,5 mL do reativo de Nelson e acrescentados 3,5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e lidos em espectrofotômetro em 540 nm.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras, foi utilizada uma curva padrão de glucose a 0,1 %. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de 10 a 80 µg, em concentrações variáveis de acordo com a estimativa do teor de carboidrato da amostra.

4.3.4 Determinação de Açúcares Totais – Método do Fenol-ácido sulfúrico

O método do fenol-ácido sulfúrico ou de Dubois (DUBOIS; GILLES; HAMILTON, 1956) foi utilizado para a determinação da concentração e detecção de carboidrato total nos sobrenadantes de cada cultivo e durante todas as etapas de purificação e caracterização estrutural do polissacarídeo. O método consiste na formação do derivado furfural pela presença de ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela. O protocolo original do método foi seguido conforme descrito:

Procedimento: foi adicionado 0,5 mL de solução de fenol a 0,5 mL de amostra e através de um jato único, foram acrescentados 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 10 minutos de repouso, as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 480 nm.

Para calcular a concentração de carboidrato, foi utilizado um padrão de glucose a 0,1 g% em uma faixa de sensibilidade de 10 a 100 µg, em concentrações variáveis de acordo com a estimativa do teor de carboidrato na amostra.

4.3.5 Determinação de Proteínas – Método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas do material extracelular foi efetuada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) durante as etapas de purificação do polissacarídeo. O princípio do método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul. O corante reage preferencialmente com resíduos de arginina e, em menor extensão, com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

Solução estoque: 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada para completar 100 mL de solução.

Solução de uso: foi feita uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque em água, seguida de filtração em papel de filtro.

Procedimento: foi adicionado 1 mL da solução com o corante a 100 µL da amostra. Em um período de 2 a 20 minutos após o início da reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A concentração de proteínas foi calculada através da curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração que variou de acordo com o teor protéico estimado para as amostras.

4.3.6 Espectrofotometria Direta a 280 nm

A detecção de proteínas pela leitura a 280 nm baseia-se na absorção de elétrons pelos anéis aromáticos dos aminoácidos fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina na faixa de luz ultravioleta (STOSCHECK, 1990). Este método foi utilizado para detecção de proteínas, durante as etapas de purificação do EPS por cromatografias, para determinação do perfil de eluição dos componentes protéicos.

4.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO

4.4.1 Purificação do Exopolissacarídeo do *Botryosphaeria* sp por Métodos Cromatográficos

4.4.1.1 Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sepharose CL-4B

O gel Sepharose CL-4B é formado por agarose, numa concentração aproximada de 4%, estabilizado por pontes de hidrogênio. Possui faixa de fracionamento de $6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ Da para proteínas e $10^4 - 10^7$ Da para polissacarídeos (BOYER, 1993).

Procedimento: a amostra foi solubilizada em água, numa concentração de 0,1% com auxílio de agitação magnética e aquecimento até 35 °C, aplicada à coluna de Sepharose CL-4B (30 x 2,5 cm) e eluída com água destilada. Foram coletadas frações de 3,5 mL a um fluxo de 0,8 mL/min. Uma alíquota de cada uma das frações foi analisada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, para detectar carboidratos e monitorada a 280 nm para proteínas.

Após a determinação do perfil de eluição, as frações referentes aos picos distintos (GP-F₁ e GP-F₂) foram reunidas e liofilizadas (GUTIÉRREZ ; PRIETO ; MARTÍNEZ, 1996).

4.4.1.2 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose (Fast Flow)

DEAE – Sepharose FF é um gel trocador aniônico fraco, muito estável, que permite trabalhar em alto fluxo de eluição (BOYER, 1993).

Procedimento: a fração majoritária em carboidrato (GP-F₁), obtida da coluna anterior, foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8 e aplicada na coluna (12 x 1,8 cm) contendo o gel DEAE – Sepharose FF, previamente equilibrada e eluída com o mesmo tampão. Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo de 0,4 mL/min. Cada fração foi lida a 280 nm para a detecção de proteínas e os carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol – ácido sulfúrico.

Após determinar o perfil de eluição, as frações referentes ao pico IE-F₂ foram reunidas, dialisadas contra água deionizada e liofilizadas.

4.4.2 Análise da Composição em Monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC)

Amostras contendo 50µg de açúcares totais, de cada etapa do processo de purificação (material extracelular, após filtração em gel e após cromatografia de troca-iônica), foram hidrolisadas pela adição de 0,5 mL de ácido trifluoracético (TFA) 5 M a 100 °C por 16 horas (GUTIÉRREZ ; PRIETO e MARTINEZ, 1996). O ácido foi removido por evaporação utilizando-se uma centrífuga a vácuo, seguido por dois ciclos de adição de 0,5 mL de H₂O e evaporação.

Padrões: como padrão, foi utilizada uma mistura contendo 200 ng/mL de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, D-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glucose.

Análise por HPAEC: os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de alta pressão consistindo de um sistema Dionex DX 500 e um Detector de Amperometria Pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador

modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente (NaOH 14 mM) usando uma coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm) equipada com uma guarda coluna PA10 com fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando H₂O deionizada (eluyente 1) e NaOH 0,2 M (eluyente 2), preparada a partir de solução de NaOH 50%. A coluna foi regenerada após 20 minutos de corrida com 100% do eluyente 2, por 15 minutos, seguida pelo retorno a NaOH 14 mM (ELIFIO et al., 2000).

4.4.3 Análise de Metilação pelo Método de Hakomori

O polissacarídeo purificado foi completamente metilado pelo método de Hakomori, hidrolisado a uma mistura de monossacarídeos parcialmente metilados, reduzido a alditóis parcialmente metilados e posteriormente acetilados. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (BIERMAN, 1989).

Procedimento: a amostra completamente seca (GP-F₁; 5 mg) foi submetida a vácuo por quarenta minutos e fluxada com gás nitrogênio, por três vezes, durante um minuto cada vez. Em seguida, foi adicionado 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução resultante, protegida da luz e à temperatura ambiente, foi submetida ao tratamento com ultra-som por cinquenta minutos, para garantir maior solubilização. Posteriormente foi acrescentado 0,4 mL do íon metil sulfinil carbanion, e a mistura foi novamente submetida ao ultra-som por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,3 mL de iodeto de metila gradualmente, seguido de mais vinte minutos de ultra-som. Na seqüência, a reação foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação magnética, por cinco horas e, ao final desse tempo, foi interrompida pelo acréscimo de 3 mL de água destilada gelada. O material foi transferido para frascos de Erlenmeyer e lavado com 4 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi desprezada e o clorofórmio contendo o polissacarídeo metilado foi lavado com água destilada por várias vezes. A água residual foi retirada com a ajuda de sulfato de sódio anidro e a solução foi filtrada em algodão. O material metilado foi transferido para balão de evaporação e levado à secura (CORRADI DA

SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993B). O procedimento de metilação foi repetido por mais duas vezes para garantir a metilação completa do polissacarídeo.

Hidrólise do Polissacarídeo Metilado: ao polissacarídeo metilado e completamente seco, foi acrescentado ácido sulfúrico 72% (v/v) em banho de gelo. Após solubilização do material, foram adicionados 4 mL de água destilada e a solução resultante foi mantida a 100^o C por 18 horas (BOUVENG et al., 1965). O excesso de ácido foi neutralizado com BaCO₃ e o filtrado, límpido, foi deionizado através de resina catiônica IRA-120 Amberlit (forma H⁺). Após a filtração, a solução foi reduzida com NaBH₄, por um período de 15 horas, à temperatura ambiente. Os íons sódio foram removidos pelo tratamento com resina IRA-120 Amberlit (forma H⁺) e o ácido bórico eliminado sob a forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol.

Acetilação: os alditóis parcialmente metilados foram acetilados com anidrido acético e piridina na proporção 1:1 (CORRADI DA SILVA et al., 1993A). Os acetatos de alditóis resultantes foram extraídos com clorofórmio e analisados por cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa (c.l.g.-e.m.) em coluna capilar preenchida com DB - 225, à temperatura de 220 °C.

4.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (r.m.n. - ¹³C)

Os espectros de r.m.n. - ¹³C do polissacarídeo foram utilizados para identificar a configuração anomérica das ligações glicosídicas do polissacarídeo. Para tal análise, foi utilizado um espectrômetro BRUKER DRX-400, incorporado ao transformados Fourier. O exopolissacarídeo purificado (GP-F₁; 15 mg/mL) e o polissacarídeo oxidado por periodato (5mg/mL) foram examinados como soluções em DMSO deuterado. As soluções (1 mL) contidas em cilindros coaxiais foram introduzidas em tubos de 100 x 10 mm d.i., mantidas a 30 °C e em 400 MHz para serem analisadas. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.) relativos à ressonância do Me₄Si (tetrametilsilane) (δ=0) determinada em experimento separado (GORIN, 1981; KRCMAR et al.,1999).

4.4.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta análise foi efetuada para confirmar a configuração anomérica das ligações glicosídicas do polissacarídeo. Os espectros foram obtidos através de um espectrômetro BRUKER modelo Vector 22, incorporado ao transformador Fourier. Os EPS foram examinados na forma microparticulada utilizando o acessório de ATR (reflexão total acumulada). Foram usados 2 mg do polissacarídeo liofilizado (GP-F₁) em 300 mg de KBr. Celulose (4mg) e amido (4mg) foram usados como padrões. As análises foram conduzidas na faixa de 1800-500 cm⁻¹ em uma resolução de 2 cm⁻¹ (SHWEIGER-HUFNAGEL et al., 2000 ; KRCMAR et al.,1999).

4.4.6 Degradação de Smith

O polissacarídeo (GP-F₁; 50 mg) foi oxidado a polialdeído através da adição de 50 mL de NaIO₄ 0,05 M. A reação foi mantida por 120 horas, a temperatura de 4 °C e na ausência de luz. O excesso do agente oxidante foi degradado pela adição de 2 mL de etilenoglicol e a solução resultante foi dialisada contra água destilada corrente, por aproximadamente 48 horas. O polialdeído resultante foi reduzido com NaBH₄ 1 M durante 18 horas, a temperatura ambiente. O excesso do agente redutor foi decomposto pela adição de solução aquosa de ácido acético glacial até pH 6,0, em banho de gelo. A solução reduzida foi dialisada contra água destilada corrente, durante 48 horas (CORRADI DA SILVA et al., 1993A; FABRE et al., 1984). A fração não dialisável foi dividida em duas partes, sendo uma delas submetida à hidrólise ácida total e a outra à hidrólise branda.

Hidrólise ácida total: o volume da fração não dialisável correspondente à massa de 0,5 mg foi evaporado à secura e submetido à hidrólise com ácido sulfúrico 0,5 M, durante 5 horas a 100 °C. O excesso de ácido foi neutralizado com carbonato de bário e a solução foi filtrada em papel. O filtrado límpido foi deionizado com resina IRA-120 Amberlit (forma H⁺) e após filtração foi evaporado até redução de volume (CORRADI DA SILVA et al., 1993A). Os

hidrolisados foram analisados por HPAEC/PAD, durante 15 minutos usando uma coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm) equipada com uma guarda coluna PA10 com fluxo de 1,5 mL/min. As condições de eluição (NaOH 52 mM) foram produzidas usando NaOH 200 mM e H₂O deionizada. A coluna foi regenerada após 15 minutos de corrida com 100% de NaOH 200 mM e assim permanecendo por 10 minutos, seguida do retorno da coluna às condições iniciais da análise por 15 minutos antes da aplicação da amostra (LEE, 1990).

Hidrólise ácida parcial: o volume da fração não dialisável correspondente à massa de aproximadamente 25 mg foi evaporado à secura e submetido à hidrólise ácida parcial, usando ácido sulfúrico 1,0 M, durante 24 horas a 50 °C, para remoção dos resíduos de açúcar oxidados ligados à cadeia principal do polissacarídeo. Após hidrólise, o material foi neutralizado com NaOH a 20%, em banho de gelo, dialisado em tubos de 10.000 MWCO, contra água destilada corrente por 48 horas e liofilizado. Uma porção do EPS oxidado e parcialmente hidrolisado, correspondente a 5,0 mg foi metilada pelo método de Hakomori por duas vezes, hidrolisada, reduzida e acetilada, como descrito no item 4.4.3. Uma outra parte, correspondente a 5,0 mg foi analisada por r.m.n. – ¹³C.

4.4.7 Hidrólise Ácida Parcial

A hidrólise ácida parcial do polissacarídeo (30 mg da GP-F₁) foi realizada com H₂SO₄ a 50% (v/v) durante 16 horas a 4°C, seguida de agitação por 1 hora a 35°C (UKAI et al., 1982; BARBOSA et al., 2003). O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário e os filtrados límpidos foram deionizados com uma resina Amberlit IR-400. Após filtração, as soluções resultantes foram evaporadas para redução de volume. Os produtos foram separados em uma coluna Sephadex G-15 (1,0 x 37 cm) calibrada com amido, melibiose e glucose, utilizando-se água com eluente com fluxo de 0,13 mL/min. As frações coletadas foram analisadas para carboidratos totais pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Tais frações foram analisadas por cromatografia de troca iônica de alta pressão (HPAEC-PAD). Os mono- e oligossacarídeos foram separados em uma coluna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm) com uma

guarda coluna (4 x 50 mm) com fluxo de 1 mL/min. A coluna foi equilibrada com 97% de NaOH 100 mM e 3% de acetato de sódio 500 mM. Após 15 minutos, um gradiente de acetato em NaOH 100 mM foi desenvolvido por um período de 1 hora até o limite de acetato de sódio 250 mM. Os monossacarídeos e os oligossacarídeos foram detectados por amperometria pulsada (Dionex DX-500) sem a adição de base pós-coluna. Os tempos de retenção do monossacarídeo e dos oligossacarídeos das frações investigadas, foram identificados por comparação com os tempos de retenção (minutos) dos padrões adquiridos da Sigma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho de dissertação estão apresentados nos artigos 1 e 2 , anexos A e B, respectivamente.

O artigo 1, intitulado: “**Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features**”, foi escrito de acordo com as normas do periódico “Journal of Basic Microbiology”.

O artigo 2, intitulado: “**Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.**”, foi escrito de acordo com as normas do periódico “Carbohydrate Research”.

6 CONCLUSÕES

- A maior produção de botriosferana foi obtida quando o fungo *Botriosphaeria* sp. cresceu em meio de cultivo contendo sacarose comercial como única fonte de carbono.
- Foram observadas quantidades decrescentes deste EPS, produzidos em outras fontes de carbono como melação de cana-de-açúcar, sacarose P.A., glucose e frutose; o manitol foi a única fonte não utilizada pelo fungo para a produção do polissacarídeo.
- A hidrólise ácida parcial seguida de análise por HPAEC mostrou glucose como o único constituinte monossacarídico e os espectros de FTIR indicaram apenas configuração β .
- Após purificação por cromatografia de filtração em gel, o botriosferana produzido em glucose foi submetido à análise estrutural:
 - Os estudos espectroscópicos por ressonância magnética nuclear de carbono treze e infravermelho, acoplado ao transformador Fourier, revelaram unidades de glucose, exclusivamente em configuração β .
 - A análise por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa dos acetatos de alditóis, parcialmente metilados, mostrou tratar-se de uma cadeia principal constituída de unidades glucopiranosídicas (1 \rightarrow 3) ligadas substituídas em O-6. Esses resultados foram confirmados por degradação de Smith, seguida de condições de hidrólise severa e branda.
 - Os resultados da hidrólise ácida parcial do botriosferana seguida de cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-15) e de cromatografia de troca iônica de alta pressão, mostraram resíduos gentiobiosídicos e gentiotriosídicos, correspondentes a ramificações β -(1 \rightarrow 6)-glucopiranosídicas e β -(1 \rightarrow 6)-gentiobiosídicas, respectivamente.
- Todas estas observações indicaram que o botriosferana produzido pelo *Botryosphaeria* sp é uma glucana β -D-(1 \rightarrow 3) com ramificações β -D-(1 \rightarrow 6)-glucopiranosídicas e β -D-(1 \rightarrow 6)-di-glucopiranosídicas (gentiobiosídicas) em uma frequência de 22%, sugerindo uma ramificação a cada cinco resíduos da cadeia principal.

REFERÊNCIAS

- BAO, X.; FANG, J.; LI, X. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex from spores of *Gonoderma lucidum*. **Biosciences of Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2384-2391, 2001.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBOKE, I.; ST HARDY, G. E. In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **Proc. 4th Pacific Rim Biotechnology Conference**. Melbourne, Austrália, p. 88-90, 1995.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; St HARDY, G. E. Veratryl alcohol as inducer of laccase by ascomycete *Botryosphaeria* sp, when screened on polymeric dye poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI da SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.
- BARNETT, C.; SMITH, A.; SCANLON, B.; ISRAELIDES, C. J. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 203-209, 1999.
- BE MILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: **Food Chemistry**. FENNEMA, O. R. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 157-223.
- BES, B.; PETTERSON, B.; LENNHOLM, H.; IVERSEN, T.; ERIKSSON, K. E. Synthesis, structure, and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 9, p. 310-318, 1987.
- BIERMANN, C. in: BIERMANN, C. & MCGINNIS, G. **Analysis of carbohydrate by glc and ms**. CRC, 1989, p. 27-41.
- BOUVENG, H. O.; LINDBERG, B. Hydrolysis of Methylated Polysaccharides. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 296-298, 1965.

BOYER, R. F. **Modern Experimental Biochemistry**. 2.ed. California: Benjamin /Cummings Publishing Company Inc., 1993, p. 59-114.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHO, D. H.; CHAE, H. J.; KIM, E. Y. Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, p. 183-193, 2001.

CORRADI DA SILVA, M. L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P. A. J. Carbohydrate, Glycopeptide and Protein Components of the Lichen *Sticta* sp. and Effect of Storage. **Phytochemistry**, v. 33, p. 547-552, 1993A.

CORRADI DA SILVA, M. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual Carbohydrates from the Lichen *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 715-717, 1993B.

COTTREL, I. W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides, in **Fungal Polysaccharides**, Sandford, P.A. and Matsuda, K. (eds), ACS Symp. Ser., Amer. Chem. Soc., v. 126, 1980, p. 262-265.

DE BAETS, S.; DU LAING, S.; FRANÇOIS, C.; VANDAMME, E. J. Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 181-184, 2002.

DE LA ROSA, R. D. Las dextranas: su efecto sobre la polarización de la sacarosa y la economía azucarera. **International Sugar Journal**, v. 100, n.1191S, 1998.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.

DEKKER, R. F. H.; VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; PACCOLA-MEIRELLES, L. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of ligninocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1987-1993, 2001.

DING, Q.; La BELLE, M.; YANG, B. Y.; MONTGOMERY, R. Physicochemical studies of extracellular polysaccharides of *Erwinia chrysanthemi* ssp. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 333-346, 2003.

DOUGLAS, C. M. Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 55-66, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.. Collorimetric method for determination of sugars and related substance. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELIFIO, S. L.; CORRADI DA SILVA, M. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictionema glabratum*. **New Phytologist**, v.145, p. 327-334, 2000.

FABRE, I.; BRUNETEAU, M.; RICCI, P.; MICHEL, G. Isolement et etude structurale de glucanes de *Phytophthora parasita*. **European Journal of Biochemistry**, v. 142, p. 99-103, 1984.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L. and STOKKE, B. T. The cytokine stimulating of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 587-596, 2000.

FARIÑA, J. I., SIÑERIZ, F., MOLINA, O. E. and PEROTTI, N. I. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 825-831, 1998.

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

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 168-174, 1998.

GORIN, P. A. J. In: **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. New York. R. L. Whistler, and J. N. BeMiller (eds). Academic Press. 1981. v. 38, p. 12-104.

GRIGOROVA, D.; PAVLOVA, K.; PANCHEV, I. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 81, p. 181-191, 1999.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

GUTIÉRREZ, A.; BOCCHINI, P.; GALLETI, G. C.; MARTÍNEZ, A. T. Analysis of lignin-polysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1928-1934, 1996.

HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulfoxide. **Journal of Biochemistry**, v. 55, p. 205-207, 1964.

HOLZWARTH, G. Xanthan and scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery. **Develop Industrial Microbiology**. v. 26, p. 271-280, 1985.

HWANG, H. J.; KIM, S. W.; XU, C. P.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 708, 2003.

JANSSON, P. E.; LINDBERG, B.; SANDFORD, P. A. Structural studies of gellum gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, v. 124, p. 135-139, 1983.

KACHHAWA, D. K.; BHATTACHARJEE, P. and SINGHAL, R. S. Studies on downstream processing of pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 25-28, 2003.

KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides. In: H. J. PEPPLER, and D. PERLMAN. (Eds) **Microbial Technology**. New York: Academic Press, 1979, p. 417-481.

KAWAHARA, H.; OBATA, H. Production of xanthan gum and ice-nucleating material from whey by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 353-358, 1998.

KIM, S. W.; XU, C. P.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; KIM, C. W.; YUM, J. W. Production and Characterization of Polysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. **Biotechnology Program**, v. 19, p. 428-435, 2003.

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

LEE, Y. C. High Performance Anion-Exchange Chromatography for Carbohydrate Analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 189, p. 151-167, 1990.

LEE, J. W.; YEOMANS, W. G.; ALLEN, A. L.; DENG, F.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. L. Biosynthesis of Novel Exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5265-5271, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000, 1152 p.

LO, Y. M, YANG, S. T.; MIN, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 689-694, 1997.

LOPEZ, M. C. A.; DE LA FUENTE, E. B.; GALINDO, E. Biopolímeros in: **Biotecnología Alimentaria**, G. Garibay, R. Quintero e A. Lopez-Munguia, eds., Mexico: Limusa Noriega Editores, 1993, p. 423-451.

MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419-426, 2002.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial Polissacharides In: **Comprehensive Biotechnology: the Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. H. W. Blanch, S. Drew, D. I. C. Wang (Eds), Pergamon Press, 1985, p. 1005-1044.

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 339-345, 1997.

MARCHETTI, M.; PISANI, S.; PIETROPAOLO, V.; SEGANTI, L.; NICOLETTI, R.; DEGENER, A.; ORSI, N. Antiviral Effect of a Polysaccharide from *Sclerotium glaucum* towards Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. **Planta Medica**, v. 62, p. 303-307, 1996.

MAUGERI FILHO, F. Produção de Polissacarídeos. In: **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. U. A. Lima,; E. Aqurone; W. Borzani; W. Schmidell, Edgard Blucher Ltda, v. 3, 2001, p. 125-154.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MENDRYGAL, K. E.; GONZÁLEZ, J. E. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 599-606, 2000.

MISAKI, A.; KAWAGUSHI, K.; MIYAJI, H.; NAGAE, H.; HOKKOKU, S.; KAKUTA M.; SASAKI, T. Structure of pestalotan, a highly branched (1→3)-beta-D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of this antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrate Research**, v. 129, p. 209-227, 1984.

MORRIS, V. J. Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems. **Food Biotechnology**, v. 4, p. 45-57, 1992.

NAVARINI, L.; BELLA, J.; FLAIBANI, A.; GILLI, R.; RIZZA, V. Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1→3)-beta-D-glucan from *Aureobasidium pullulans*. **Internatinal Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 157-163, 1996.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 376-380, 1944.

OSAKU, C. A.; SASSAKI, G. L.; ZANCAN, G. T.; IACOMINI, M. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, p. 145-149, 2002.

PAZUR, J. H. Neutral Polissacarídeos. In: M. F. CHAPLIN and J. F. KENNEDY (Eds) **Carbohydrate Analysis: A Practical Approach**. 2.ed. Oxford - U.K.: Oxford University Press, 1994, p. 73-124.

PHILLIPS, K. R. and LAWFORD, H. G. Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentation. **Program of Industrial Microbiology**, v. 18, p. 201-229, 1983.

PIGATTO, M. M. **Produção de Exopolissacarídeo pelo Fungo Ligninolítico *Botryosphaeria* sp.** (Monografia de Especialização em Bioquímica). UEL. Londrina, 2002.

PYROG, T. P. Biological functions of microbial exopolisaccharides. **Mikrobiologicheskii Zhurnal**, v. 63, p. 80-101, 2001.

RAMOS, L. J.; DAVENPORT, T. L.; MCMILLAN, R. T.; LARA, S. P. The resistance of mango (*Mangifera indica*) cultivars to tip dieback disease in Florida. **Plant Disease**, v. 81, p. 509-514, 1997.

ROBYT, J. F. Dextran. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. v. 4, 2^a ed, John Wiley & Sons, New York, p. 752-767, 1986.

ROUHIER, P.; KOPP, M.; BEGOT, V.; BRUNETEAU, M.; FRIGIT, B. Structural features of fungal β -D-glucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 56-62, 1995.

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 72-81, 1991.

SAITÔ, H.; YOKOI, M.; YOSHIOKA, Y. Effect of hydration on conformational changes or stabilization of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans of various chain lengths in the solid state as studied by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. **Macromolecules**, v. 22, p. 3892-3898, 1989.

SCHMID, F.; STONE, B. A.; MCDUGALL, B. M.; BACIC, A.; MARTIN, K. L.; BROWNLEE, R. T. C.; CHAI, E.; SEVIOUR, R. J. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. **Carbohydrate Research**, v. 331, p.163-171, 2001.

SCHUSTER, R., WENZIG, E., MERSMANN, A. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 155-158, 1993.

SCHWEIGER-HUFNAGEL, U.; ONO, T.; IZUMI K.; HUFNAGEL P.; MORITA N.; KAGA H.; MORITA M.; HOSHINO T.; YUMOTO I.; MATSUMOTO N.; YOSHIDA M.; SAWADA M. T. ; OKUYAMA, H. Identification of Extracellular Polysaccharide Produced by the Snow Mold Fungus *Microdochium nivale*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 183-187, 2000.

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

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICE, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and characterization of the exopolysaccharide of the Antartic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 585-592, 2002.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS, P. A. Production of Pullulan and other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi. **Critical Reviews in Biotechnonology**, v. 12, p. 279-298, 1992.

SHAH, V.; RAY, A.; GARG, N.; MADAMWAR, D. Characterization of the Extracellular Polysaccharide Produced by Cyanobacterium, *Cyanothece* sp ATCC 51142, and Its Exploitation Toward Metal Removal from solutions. **Current Microbiology**, v. 40, p. 274-278, 2000.

SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 447-460, 2004.

SIDEBOTHAM, R. L. Dextran. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 30, p. 371-444, 1974.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SON, H. J.; HEO, M. S.; KIM, Y. G.; LEE, S. J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology Applied in Biochemistry**, v. 33, p. 1-5, 2001.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and Biology of β -1,3-Glucans**. La Trobe University Press: Australia, 1992.

STOSCHECK, C. M. Quantification of protein. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 50-68, 1990.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech January**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides**. Cambridge University Press: NY, 1990.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 478-484, 2003.

UKAI, S.; YOKOYAMA, S.; HARA, C.; KIHU, T. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Ganoderma japonicum* LLOYD. **Carbohydrate Research**, v. 105, p. 237-245, 1982.

VARGAS-GARCIA, M. C.; LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. A.; MORENO, J. Physiology of exopolysaccharide production by *Azobacter vinelandii* from 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p.129-133, 2002.

VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of Laccase Production by *Botryosphaeria* sp in the Presence of Veratryl Alcohol by the Response Surface Method. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1131-1138, 2000.

VILOCHE-BAZAN, J. H.; Estudo da produção enzimática da dextrana clínica. Campinas, 1994. 138 p. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, 931 p.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied of Microbiology in Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)-β-D-Glucan Immunobiology. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 247-250, 1997.

YADOMAE, T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucan. **Yakugaku Zasshi**, v. 120, p. 413-431, 2000.

YANG, F. C.; KE, Y. F.; KUO, S. S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 295-301, 2000.

YUAN, Z. Q.; MOHAMMED, C. Investigation of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 26, p. 78-84, 1997.

ZHANG, L. H.; WANG, H. X.; WANG, L. W.; XIAO, P. G. Immunological effect of *Ganoderma lucidum* spore extract *in vivo* and *in vitro*. **Chinese Journal Immunology**, v. 10, p. 169-172, 1994.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo 1: “Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features”

ANEXO A – Artigo 1: “Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features”

(¹Departamento de Bioquímica, CCE; Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990 - Londrina - Paraná, Brazil; ²Departamento de Física, Química e Biologia, FCT, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente - São Paulo, Brazil.)

Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features

ROSANGELA M. STELUTI¹, ELLEN C. GIESE¹, MARIANE M. PIGGATO¹, ANDRESSA F. G. SUMIYA¹, LUIZ G. COVIZZI¹, ALDO E. JOB², MARILSA S. CARDOSO², MARIA DE LOURDES CORRADI DA SILVA², ROBERT F. H. DEKKER¹ AND ANELI M. BARBOSA^{1*}.

Short title: Botryosphaeran production

Abstract

The influence of glucose concentration and other carbohydrates (monosaccharides: fructose, galactose, mannose; polyols: mannitol and sorbitol; disaccharides: lactose, sucrose and commercial sucrose; and industrial sugarcane molasses) were compared as sole carbon sources for the production of Botryosphaeran, an exopolysaccharide (EPS) produced by *Botryosphaeria*

sp. The optimum glucose concentration for EPS production was 50 g l⁻¹. With the exception of mannitol, the fungus produced EPS on all carbon sources studied, with highest yields occurring with sucrose followed by glucose. All EPS showed exclusively glucose after acid hydrolysis and monosaccharide analysis. FTIR spectroscopy demonstrated the presence of β -anomers indicating that all the EPS produced by *Botryosphaeria* sp. on the different carbon sources were essentially β -D-glucan type.

Introduction

Microorganisms produce polysaccharides of three distinct kinds: intracellular (storage), extracellular (EPS) and structural forms. The EPS forms can be classified as capsular; those that are integral with the cell wall, and those produced as loose slimes that accumulate in large quantities outside the cell wall and diffuse into the culture medium (SUTHERLAND 1998; RAMESH & THARANATHAN 2003). Many fungi produce extracellular homopolymers of glucose during growth, and these find commercial applications in the food, cosmetics and pharmaceutical industries. Furthermore, fungal glucans of the $\beta(1\rightarrow3)$ and $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ - types are known to possess anti-tumor, anti-inflammatory and immunomodulation activities (WASSER 2002). The most studied fungal $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ -glucan is scleroglucan produced by *Sclerotium rolfsii* (FARINÃ *et al.* 1998) and *S. glaucanicum* (SELBMANN *et al.* 2002).

The ascomycete, *Botryosphaeria* sp., a ligninolytic fungus, produced a β -glucan on glucose as sole carbon source (DEKKER & BARBOSA 2001), and was characterized structurally as a $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ -D-glucan with approximately 22% side branching on C-6, and named: Botryosphaeran (BARBOSA *et al.* 2003). The products obtained from partial acid hydrolysis

demonstrated that the side branches consisted of single (1→6)- β -linked glucosyl and gentiobiosyl residues (BARBOSA *et al.* 2003).

Many microorganisms producing polysaccharides respond to environmental factors directly, and for some, the carbon source determines both the quantity of polysaccharide formation, and the quality of the product synthesized (YANG & HWANG 1998; ROSADO *et al.* 2003). The study of the influence of culture medium composition to improve EPS production by the genus *Botryosphaeria* has not been examined in detail, although SELBMANN *et al.* (2002) reported on conditions for EPS production by *B. rhodina* using raw starch material. However, there is no study on the influence of glucose concentration and different monomeric and dimeric carbohydrate sources on the production of EPS by *Botryosphaeria* sp.

Herein we report on the evaluation of the influence of glucose concentration, and other carbohydrate carbon sources (monosaccharides: fructose, galactose, mannose; sugar alcohols: mannitol and sorbitol; disaccharides: lactose, sucrose; and commercial sucrose; and industrial sugarcane molasses) on Botryosphaeran production, monosaccharide composition, and the configuration of the glycosidic linkages of each of the Botryosphaerans produced by *Botryosphaeria* sp. when grown on these carbon sources.

Materials and Methods

Microorganism and cultivation: *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5 (BARBOSA *et al.* 1996) was maintained, through period transfer, at 4 °C on PDA. Inoculum was prepared by growing *Botryosphaeria* sp. on agar plates containing Vogel minimal salts medium (VMSM; VOGEL, 1956), agar (20 g l⁻¹), and glucose (10 g l⁻¹) for 96 h at 28°C. Mycelium was transferred to 4

Erlenmeyer flasks (125 ml) containing 25 ml of VMSM, glucose (5 g l⁻¹) and grown for 48 h at 28 °C (pH 5.8), under shaking conditions (180 rpm). Pre-cultures were homogenised (sterilised chilled Blender) for 0.5 min at maximum speed. The cell homogenate was then centrifuged, the mycelium recovered and to which was added sterilized physiological saline to give a standard solution with an absorbance of 0.4 to 0.5 (400 nm). The standardised inoculum (1 ml aliquots) was used to inoculate 25 ml of VMSM containing glucose at the following concentrations 25, 50 and 75 g l⁻¹.

EPS production and determination: *Botryosphaeria* sp. was grown in submerged culture in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of VMSM and 50 g l⁻¹ glucose (determined as the optimal concentration for EPS production) as the sole carbon source. Cultures were incubated at 28 °C on a rotary shaker at 180 rpm. In experiments where other carbohydrates (galactose, lactose, sucrose, commercial sucrose, mannose, sugarcane molasses, mannitol, sorbitol, fructose) replaced glucose in the culture medium as sole carbon source, these were added to the VMSM at a concentration of 50 g l⁻¹. All cultivations were conducted in submerged liquid culture at 28 °C on a rotary shaker at 180 rpm. EPS was determined by precipitation of the cell-free culture fluid with 4 volumes of absolute ethanol, the precipitate recovered, dialysed for 48 h at 4 °C against several changes of water and filtered on pre-weighed filter paper, and dried to constant weight at 70 °C. Viscosity of the culture fluid was determined with a Brookfield Viscometer (S 18 and 1 rpm). All experiments were carried out in triplicate, and values reported represent average values ± SD.

Analytical techniques: *Reducing sugars were determined by the method of NELSON (1944) and SOMOGYI (1945). Total sugars were measured by the phenol-sulfuric acid method of DUBOIS et al. (1956). In both types of assays used to determine residual sugar concentrations, the carbohydrates used as carbon sources were used as the reference standards. Fungal biomass*

was determined gravimetrically following the recovery of the mycelium by centrifugation (1250 x g for 30 min) and dried to constant weight at 70 °C.

Monosaccharide analysis: Monosaccharide components were determined by hydrolysis of exopolysaccharide (0.05 mg) with 5 M TFA (trifluoroacetic acid, 0.50 ml) at 100 °C for 16 h. The hydrolysate solutions were evaporated under reduced pressure and the residues dissolved in 0.5 ml of water and evaporated again. The dissolution and evaporation cycle was repeated twice. Finally, the residue was dissolved in 0.2 ml of water and 0.025 ml aliquots used for monosaccharide analysis by HPAEC/PAD (High Performance Anionic Exchange Chromatography Pulsed Amperometric Detection from Dionex DX 500). Neutral monosaccharides were separated isocratically (0.014M NaOH) using a CarboPac PA-10 (Dionex Chromatography) column (4 x 250 mm) equipped with a PA-10 guard column at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ as previously described (BARBOSA et al. 2003). Elution conditions were produced using water (eluent 1) and 0.2 M NaOH (eluent 2). The column was regenerated, after 20 min using 100 % of eluent 2 for 15 min, followed by a return to 0.014 M NaOH. Monosaccharide quantification was carried out from peak area measurements using response factors obtained from standard monosaccharides.

FTIR: FTIR spectroscopy was performed using a Bruker Vector 22 Model FTIR Spectrometer with freeze-dried samples of each exopolysaccharide (2 mg) in KBr (300 mg) discs. Scans were conducted in the range 1800 - 500 cm⁻¹ at a resolution of 2 cm⁻¹.

Results

Botryosphaeran production was similar when *Botryosphaeria* sp. was grown on 50 and 75 g l⁻¹ glucose (Table 1). However, highest residual glucose (5.6 g l⁻¹) remained in the culture fluid (CF) when *Botryosphaeria* sp. cultures were grown on the higher 75 g l⁻¹ glucose concentration

(see Table 1). Although more mycelial biomass was produced at the higher glucose concentration, the highest viscosity (12.3 Cp) was exhibited in fungal cultures grown on 50 g l⁻¹ glucose. Table 1 also shows that the final CF pH values were lower compared to the initial pH (5.8), and the reduction in pH was largest at the highest glucose concentration studied (75 g l⁻¹).

Table 1

Botryosphaeran and biomass production by *Botryosphaeria* sp. grown on different glucose concentrations.

| Glucose (g l ⁻¹) | pH _f ^a | EPS ^b (g l ⁻¹) | Biomass (g l ⁻¹) | RTS ^c (g l ⁻¹) | RRS ^d (g l ⁻¹) | Viscosity (Cp) |
|---------------------------------|------------------------------|--|---------------------------------|--|--|-------------------|
| 25 | 5.4 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 10.6 ± 0.7 | 1.0 ± 0.4 | 0.1 ± 0.0 | 6.1 ± 0.4 |
| 50 | 5.1 ± 0.4 | 1.7 ± 1.0 | 13.4 ± 0.9 | 2.4 ± 0.8 | 0.1 ± 0.1 | 12.3 ± 0.2 |
| 75 | 4.5 ± 0.9 | 1.7 ± 0.4 | 15.5 ± 0.8 | 7.7 ± 1.0 | 5.6 ± 0.3 | 10.7 ± 0.5 |

^a pH_f, final pH (initial pH 5.8); ^b exopolysaccharide Botryosphaeran; ^c RTS, residual total sugars; ^d RRS, residual reducing sugars

The profiles of fungal growth and Botryosphaeran production (Fig. 1) on 50 l⁻¹ glucose over 144 h showed that after 72 h, the fungus reached stationary phase concomitantly with EPS production reaching a plateau. Beyond this time no further reducing sugars (glucose) were detectable in the CF indicating that all glucose had been consumed. A profound pH decrease was observed at 48 h during the exponential growth phase. This trend was also observed for laccase production by *Botryosphaeria* sp. (DEKKER & BARBOSA 2001).

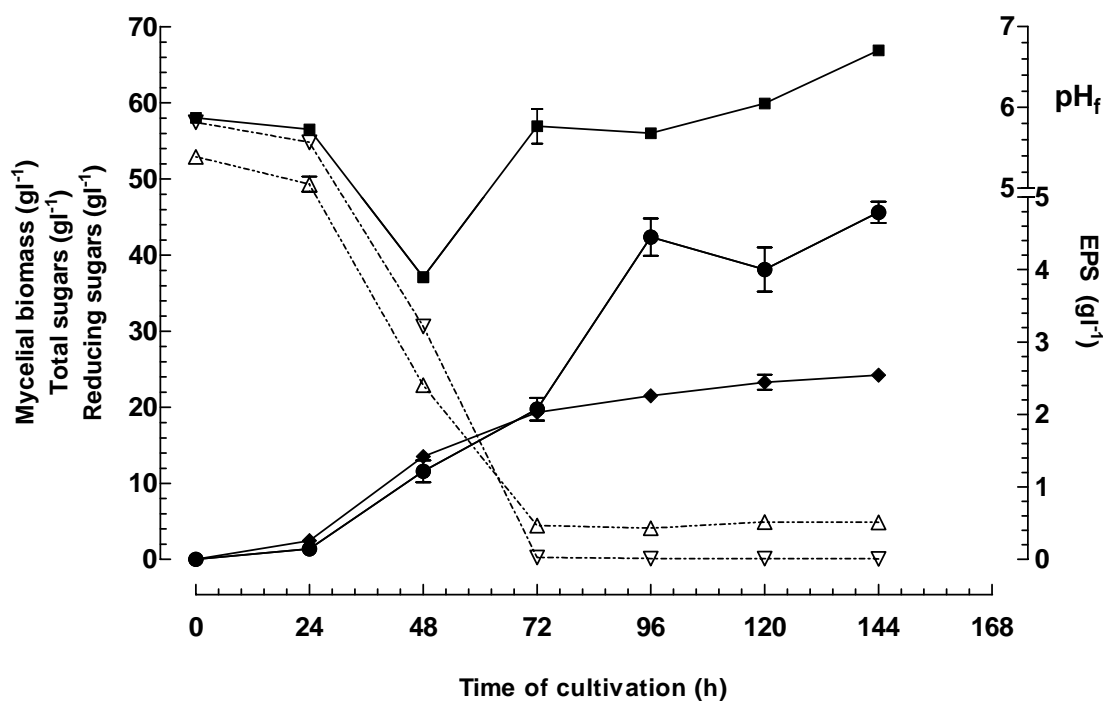


Fig. 1

Profiles showing the growth and production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria* sp. cultured on 50 g l^{-1} glucose. (●, EPS dry wt; ◆, mycelial biomass dry wt; ■, final pH (pH_f); △, residual total sugars; ▽, residual reducing sugars).

Commercial sucrose, sugarcane molasses and analytical grade sucrose, followed by glucose were found to be the best carbohydrate carbon sources for the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria* sp. (Table 2). Sorbitol, galactose and lactose promoted lowest Botryosphaeran yields, while no EPS was detected when *Botryosphaeria* sp. was grown on mannitol. Highest mycelial biomass production occurred when *Botryosphaeria* sp. was cultivated on sugarcane molasses, while the lowest yields arose from sorbitol, lactose, galactose and mannitol. With the exception of sugarcane molasses and galactose, all fungal cultures with other carbohydrate carbon sources had the final pH decreased, or maintained the same initial pH (mannitol and lactose) although the fungus did not grow well on the last two sugar sources.

Table 2

Influence of different carbohydrate carbon sources on the production of Botryosphaeran and biomass by *Botryosphaeria* sp.

| Carbon Source | pH _i | pH _f | Biomass (g l ⁻¹) | EPS (g l ⁻¹) |
|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Glucose | 5.74 | 3.97 | 15.4 ± 2.2 | 2.8 ± 0.5 |
| Fructose | 5.76 | 3.94 | 13.6 ± 0.1 | 1.9 ± 0.5 |
| Mannose | 5.64 | 3.68 | 6.0 ± 0.8 | 0.6 ± 0.3 |
| Galactose | 5.78 | 5.83 | 0.3 ± 0.0 | 0.2 ± 0.2 |
| Mannitol | 5.73 | 5.73 | 1.0 ± 0.6 | 0.0 |
| Sorbitol | 5.77 | 5.53 | 3.2 ± 0.5 | 0.3 ± 0.2 |
| Lactose | 5.8 | 5.81 | 1.4 ± 0.5 | 0.2 ± 0.1 |
| Sucrose | 5.74 | 5.11 | 17.7 ± 1.9 | 3.1 ± 0.1 |
| Commercial sucrose | 5.87 | 5.01 | 17.4 ± 2.6 | 3.7 ± 0.5 |
| Sugarcane molasses | 5.35 | 6.13 | 18.3 ± 3.1 | 3.5 ± 0.3 |

pH_i, initial pH; pH_f, final pH.

All of the EPS's produced on the different carbon sources examined in this work were found to consist exclusively of glucose (Fig. 2) after their hydrolysis by acid and analysis by HPLC.

FTIR spectroscopy allowed the determination of the composition and the types of linkages of the EPS produced by *Botryosphaeria* sp. grown on the different carbon sources (Fig. 3). The band at 882 cm⁻¹ indicated β-configuration of the main linkages (the band at 1370 cm⁻¹ was also characteristic of β-glucans), and those at 1150, 1110, 1040 and 1000 cm⁻¹ were due to (1,3)-di-*O*-substituted glucose residues.

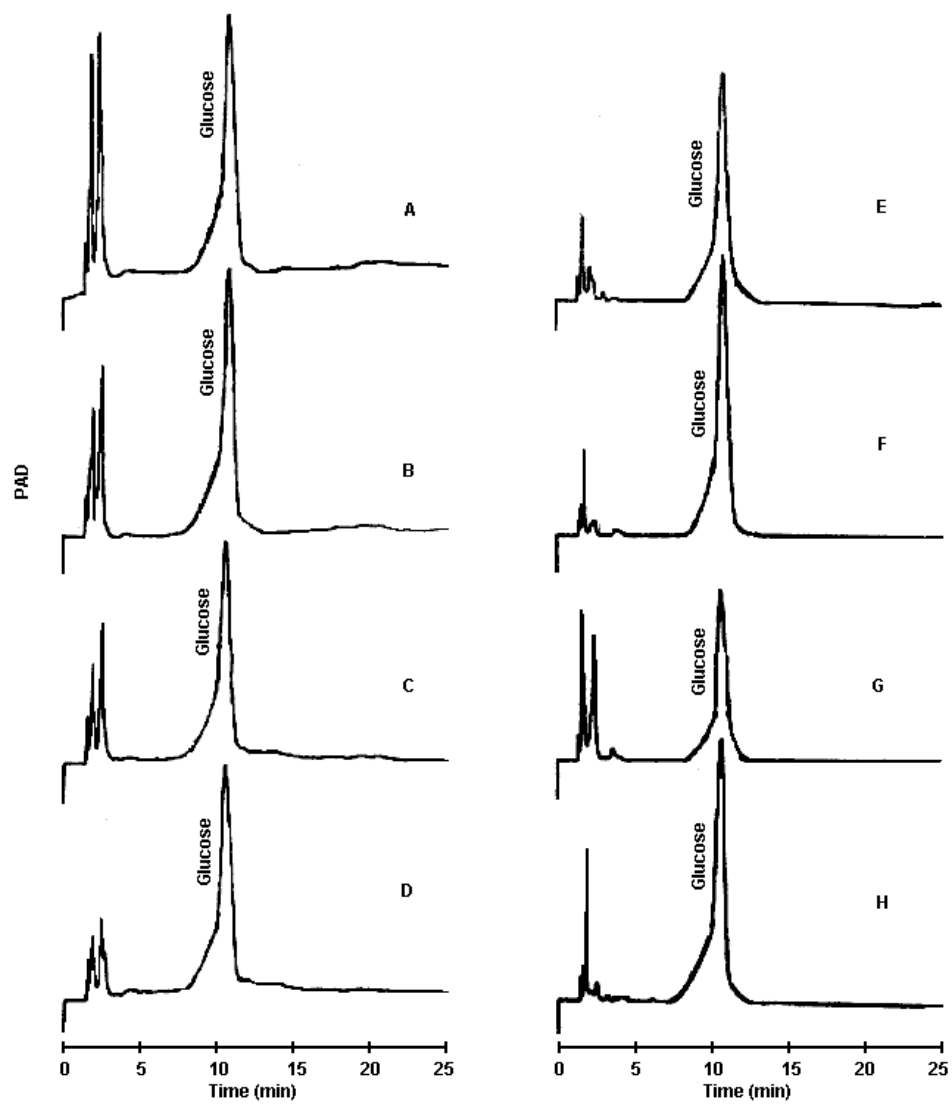


Fig. 2

HPAEC/PAD analysis of the *Botryosphaerans* obtained on different carbon sources (A-H) following acid hydrolysis. A: Fructose; B: Sucrose; C: Glucose; D: Sugarcane molasses; E: Galactose; F: Commercial sugar; G: Sorbitol; H: Mannose.

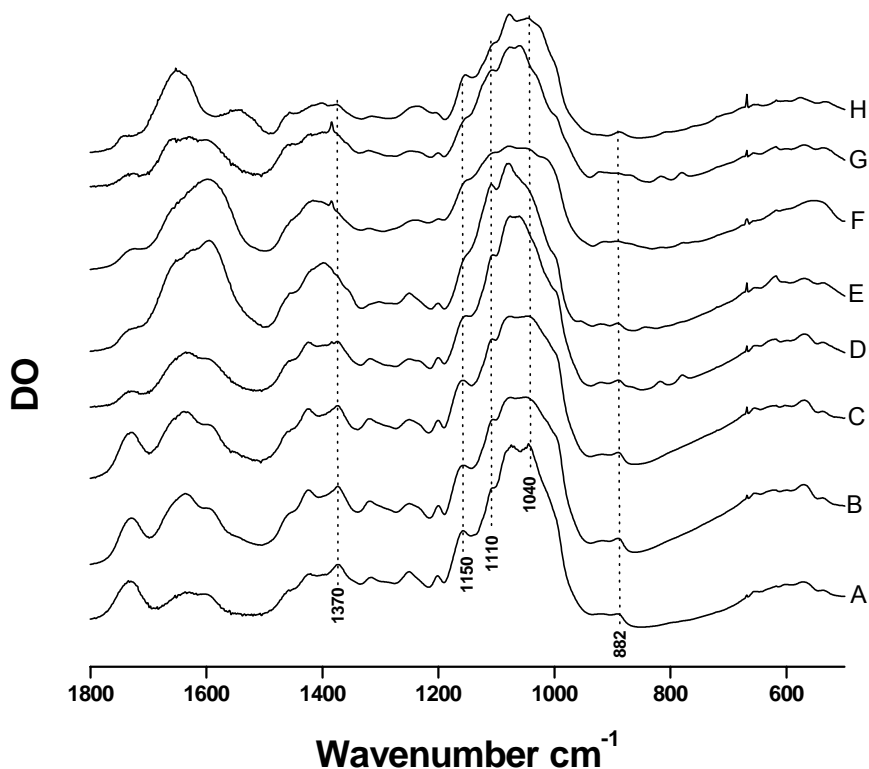


Fig 3

FTIR Spectra (1800 to 600 cm^{-1} region) of the *Botryosphaerans* obtained from *Botryosphaeria* sp. grown on different carbon sources (A-H). A: Fructose; B: Sucrose; C: Glucose; D: Sugarcane molasses; E: Galactose; F: Commercial sugar; G: Sorbitol; H: Mannose.

Discussion

Botryosphaeria sp. has been extensively studied in our lab for laccase production using inocula comprising agar plugs covered with mycelium (VASCONCELOS *et al.* 2000; DEKKER & BARBOSA 2001). However, when this type of inoculum was used for EPS production, the EPS secreted in the culture fluid became attached to the mycelium-colonised agar plugs resulting in the production of a solid mass (bolus), which made it impossible to quantify the EPS produced. In the present work the inoculum was standardised using a blended liquid mycelial preparation

obtained by growing the pre-cultures at low glucose concentration. This step ensured minimising the viscosity (low EPS), which would otherwise interfere in the preparation of mycelium for the standard inoculum, whose concentration could then be conveniently determined spectrophotometrically. Using the standardised inoculum approach, it was possible to extend the glucose concentration range up to 75 g l^{-1} and allowed the determination of the optimal concentration of glucose (50 g l^{-1}) for the production of Botryosphaeran. Our glucose value was higher than that used to produce β -glucans by *Phanerochaete chrysosporium* (2.4 g l^{-1} glucose, LEISOLA *et al.* 1982), and some basidiomycetes (39 g l^{-1} glucose, MAZIERO *et al.* 1999). Similarly, from a screening survey of fungal species for EPS production, an isolate of *B. rhodina* was found to be the best producer (SELBMANN *et al.* 2003) using a complex medium containing yeast extract and 30 g l^{-1} glucose as carbon source. Fungal exopolysaccharides have generally been quantified by the gravimetric method (MAZIERO *et al.* 1999; SELBMANN *et al.* 2002; BARBOSA *et al.* 2003) after precipitation with ethanol. Another method that has been used to quantify EPS included measuring total sugars by the phenol sulfuric method (YURLOVA & HOOG 1997), but this procedure is only reliable if the residual glucose (measured as reducing sugars) is near zero. The result then represents EPS.

The growth and Botryosphaeran production profiles on 50 g l^{-1} glucose showed that in 24 h the fungus reached exponential growth phase indicating that the inoculum concentration was adequate provided the lag phase was short. We have observed that during the stationary phase (72 h), which corresponded with optimal EPS production, glucose (reducing sugar) was almost totally consumed, but total sugar was still present in the CF demonstrating the presence of Botryosphaeran, which could be detected until 144 h growth. Thereafter, the EPS was used by the fungus as a substrate to support growth. Although the culture conditions were completely

different, SELBMANN *et al.* (2003) reported maximum EPS production within 24 h for *B. rhodina* at which stage most of the glucose had been consumed.

Glucose is biologically the most effective energy source, however, sucrose seemed to be favored for Botryosphaeran formation by *Botryosphaeria* sp. Although YANG & HWANG (1998) reported the fungus *Ganoderma lucidum* produced exopolysaccharide when grown on mannitol and sorbitol, *Botryosphaeria* sp. by contrast, grew poorly on these substrates and produced only trace amounts of EPS.

Spectroscopy methods constitute an important tool in connection with structural characterisation of carbohydrate polymers (XIAO *et al.* 2001; BARBOSA *et al.* 2003). FTIR signals at 882 and 1370 cm^{-1} were characteristic of β -anomers, indicating that the EPS was of the β -glucan type. These signals were observed for β -glucans from several fungi (MA *et al.* 1991; KRCMAR *et al.* 1999; SANTOS *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2001).

According to some reports, different carbon sources generate similar bioactive polymers with different degrees of branching and distinct degrees of polymerisation, producing biopolymers that are more or less water-soluble, and as a consequence, may possess higher or lower biological activities (ZHANG *et al.* 1995; JIN *et al.* 2003).

In conclusion, these results showed that *Botryosphaeria* sp. produced more EPS on sucrose than glucose or fructose, and the Botryosphaerans obtained on the different carbon sources were of the β -glucan type. Mannitol was the only carbon source that did not support the production of Botryosphaeran under the conditions studied.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, PRPPG-UEL, Fundação Araucária-PR for financial support. Ellen Cristine Giese, Luiz Gustavo Covizzi, and Andressa F. Sumyia gratefully acknowledge CNPq, CNPq-PIBIC and IC-UEL, respectively, for their scholarships.

References

- BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F. H. and HARDY, G. E., 1996. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye, Poly R-478. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 93-96.
- BARBOSA, A.M., STELUTI, R.M., DEKKER, R.F.H., CARDOSO, M.S. and CORRADI DA SILVA, M.L., 2003. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydr. Res.*, **338**, 1691-1698.
- DEKKER, R. F. H. and BARBOSA A. M., 2001. The effect of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 81-88.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- FARIÑA, J. I., SIÑERIZ, F., MOLINA, O. E. and PEROTTI, N. I., 1998. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: influence of medium composition. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 825-831.

- JIN, Y., ZHANG, L., CHEN, L., CHEN, Y., CHEUNG, P.C.K. and CHEN, L., 2003. Effect of culture media on the chemical and physical characteristics of polysaccharides isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydr. Res.*, **338**, 1507-1515.
- KRCMAR, P., NOVOTNY, C., MARAIAS, M-F and JOSELEAU, J-P., 1999. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 61-64.
- LEISOLA, M., BROWN, C., LAURILA, M., ULMER, D. and FIECHTER, A., 1982. Polysaccharide synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* during degradation of kraft lignin. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 180-184.
- MA, Y., MIZUNO, T. and ITO, H., 1991. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a chinese mushroom, "Huangmo", the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. *Agr. Biol. Chem.*, **55**, 2701-2710.
- MAZIERO, R., CAVAZZONI, V. and BONONI, V.L.R., 1999. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Rev. Microbiologia*, **30**, 77-84.
- NELSON, N. A., 1944. Colorimetric adaptation of the somogyi method for determination of glucose. *J. Biochem.*, **153**, 376-380.
- RAMESH, H.P. and THARANATHAN, R.N. 2003. Carbohydrates- the renewable raw materials of high biotechnological value. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **23**, 149-173.
- ROSADO, F.R., GERMANO, S., CARBONERO, E.R., COSTA, S.M.G., IACOMINI, M. and KEMMELMEIER, C., 2003. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing., and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. *J. Basic Microbiol.*, **43**, 230-237.

- SANTOS, A., MARQUINA, D., LEAL, J.A. and PEINADO, J.M., 2000. (1→6)- β -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. Appl. Environ. Microbiol., **66**, 1809-1813.
- SCHWEIGER-HUFNAGEL, U., ONO, T., IZUMI, K., HUFNAGEL, P., MORITA, N., KAGA, H., MORITA, M., HOSHINO, T., YUMOTO, I., MATSUMOTO, N., YOSHIDA, M., SAWADA, M.T. and OKUYAMA, H., 2000. Identification of the extracellular polysaccharide produced by snow mold fungus *Microdochium nivale*. Biotechnol. Lett., **22**, 183-187.
- SELBMANN, I., CROGNALE, S. and PETRUCCIOLI, M., 2002. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. Lett. Appl. Microbiol., **34**, 51-55.
- SELBMANN, L., STINGELE, F. and PETRUCCIOLI, M., 2003. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. Antonie van Leeuwenhoek, **84**, 135-145.
- SOMOGYI, M. A., 1945. A new reagent for determination of sugars. J. Biol. Chem., **160**, 61-68.
- SUTHERLAND, I. W., 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. TIBTECH, **38**, 41-47.
- VASCONCELOS, A F.D., BARBOSA, A M., DEKKER, R.F.H., SCARMINO, I.S. and REZENDE, M.I., 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by response-surface method. Process Biochem., **35**, 1131-1138.
- VOGEL, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. Genet. Bull., **13**, 42-43.
- WASSER, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol., **60**, 258-274.

- XIAO, B., SUN, X.F. and SUN, R.C., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins, hemicelluloses and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stabil.*, **74**, 307-319.
- YANG, F-C. and HWANG, S-Y., 1998. Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Tunghai J.*, **39**, 1-10.
- YURLOVA, N. A. and HOOG, G. S., 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, **72**, 141-147.
- ZHANG, L., YANG, L., DING, Q. and CHEN, X., 1995. Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricula-judae*. *Carbohydr. Res.*, **270**, 1-10.
- ZHANG, L., ZHANG, M., DONG, J., GUO, J., SONG, Y. and CHEUNG, P. C., 2001. Chemical Structure and Chain Conformation of the Water-Insoluble Glucan Isolated from *Pleurotus tuber-regium*. *Biopolym.*, **59**, 457-464.

Author for correspondence and reprint requests:

Professora Dra. Aneli M. Barbosa

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia(CCE)

Universidade Estadual de Londrina

Caixa Postal 6001

CEP 86051-990 - Londrina – Paraná

BRAZIL

Fax: +55-43-3371-8642; E-mail: aneli@uel.br

ANEXO B

Artigo 2: “Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.”

O artigo 2 foi publicado no periódico: “Carbohydrate Research”.

ANEXO B – Artigo 2: “Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.”

**Structural characterization of Botryosphaeran: a
(1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus,
Botryosphaeria sp.**

Aneli M. Barbosa^a, Rosângela M. Steluti^b,

Robert F.H. Dekker^a, Marilsa S. Cardoso^c, M.L. Corradi da Silva^{c*}

^a Universidade Estadual de Londrina, CCE, Departamento de Bioquímica,

CEP 86051-990, Londrina - PR, Brazil

^b Universidade do Oeste Paulista, Departamento de Bioquímica,

CEP 19050-900, Presidente Prudente - SP, Brazil

^c Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Física,

Química e Biologia, CEP 19060-900, Presidente Prudente - SP, Brazil

* Corresponding author. *E-mail address:* corradi@prudente.unesp.br (M.L. Corradi da Silva)

1. Introduction

Exopolysaccharides (EPS) are widely produced by microorganisms including the fungi. Many bacteria have been exploited for the commercial production of polysaccharides which find applications in foods, cosmetic and pharmaceutical products, mainly as viscosity enhancers, and have included xanthan, dextran, curdlan, gellan and pullulan.

There is now increasing interest in EPS derived from fungi^{1,2}, especially the basidiomycetes, as these fungi were used therapeutically in traditional Chinese and Japanese medicines to treat certain human diseases including cancers². EPS from several fungi have been demonstrated to possess interesting biological activities such as anti-tumor, anti-inflammatory, and immuno-modulation (cytokine stimulation)^{2,3}. One group of carcinostatic substances has been identified in several mushrooms, and were linked to polysaccharides of the β -glucan type, viz., the $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ -glucans. These complex polysaccharides have been considered useful in immunotherapy^{2,4}. The chemistry and biology of the $(1\rightarrow3)$ - β -glucans has been discussed by Stone and Clarke⁵, and their structure-functional activity reviewed^{2,6}. Fungal $(1\rightarrow3)$ - β -glucans are also known to act as phytotoxic agents causing plant diseases⁷, but can also prevent diseases in plants as viral inhibitors⁸.

Fungi belonging to the genus *Botryosphaeria* are well recognised as plant pathogens causing various diseases in plants of commercial importance, including storage rots in preharvested fruits^{9,10}. *Botryosphaeria* has been demonstrated as ligninolytic¹¹ and produced enzymes degrading the lignified plant cell wall¹². The fungus was reported to produce an EPS tentatively identified as a β -glucan¹³. EPS may be linked directly to the pathogenicity of the fungus, and in woody plants could cause plant vessel blockage through “gumming” resulting in

limb dieback diseases. An EPS from *Botryosphaeria rhodina* was recently reported^{14,15}. In the present study we report on the structural characterization of Botryosphaeran, the exopolysaccharide secreted by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5.

2. Results and discussion

Analysis and polysaccharide fractionation. - The amount of the exopolysaccharide, Botryosphaeran, produced under the culture conditions was 1.7 g/L. The crude EPS freeze-dried preparation constituted 86% carbohydrate and 14% protein. Acid hydrolysis showed glucose as the main monosaccharide (98%) with traces of mannose and glucosamine also being present; both probably associated with a glycoprotein. Gel permeation chromatography of the EPS showed two fractions, GP-F₁ and GP-F₂, both eluting after the column void volume (Fig. 1), with GP-F₁ containing the higher proportion of carbohydrate (96%; 4% protein). When this fraction was subjected to DEAE-Sepharose chromatography, the resulting principal fraction (IE-F₂) showed only a minor difference in carbohydrate content (97%; 3% protein) compared to GP-F₁. Its high viscosity prevented obtaining large amounts of fraction IE-F₂, consequently GP-F₁ was chosen as suitable for structural characterization.

Methylation analysis of GP-F₁ (Fig. 2A) showed 2,3,4,6-tetra-O-methyl glucose, 2,4,6-tri-O-methyl glucose, 2,3,4-tri-O-methyl glucose, and 2,4-di-O-methyl glucose as the main methylated sugar derivatives in the relative molar proportion of 26:36:16:22, respectively. This demonstrated that the exopolysaccharide was a glucan consisting of a (1→3)-linked glucosyl backbone substituted with approximately 22% branch points on C-6. These results were in agreement with other similar β-glucans produced by fungi¹⁶⁻¹⁹ and lichens²⁰.

^{13}C -NMR studies showed that all carbon lines were resolved and the chemical shifts (Table 1) were in accordance with values reported in the literature^{19,20}. The ^{13}C -NMR data did not reveal peaks corresponding to the α -configuration of the anomeric carbon; α -glucose anomeric carbons resonate at approximately δ 100.0 ppm, and anomeric β -glucose carbons²⁶ slightly downfield at δ 104.0 ppm. Peaks were only visible between δ 103.3 and 102.9 ppm, strongly indicating that only β -anomeric carbons were present. Evidence supporting β -anomeric carbons in the EPS was confirmed by FTIR spectroscopy (data not presented), with bands at 890 cm^{-1} being typical of (1 \rightarrow 3)- β -glucans²¹, and that at 1370 cm^{-1} being characteristic of β -glucans¹⁹.

The signal at δ 103.1 was attributed to 3-O substituted glucose anomeric carbon and compared with the signal at C-1 of the residual linear polysaccharide obtained after Smith degradation (Table 1). A general rule for β -anomeric carbon glycosylation explains that there is an upfield chemical shift; in the case of Botryosphaeran, this is shown by a signal at δ 102.9, which is attributable to 3-O-substituted glucose units of the main chain containing branched residues (β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl; gentiobiosyl) at C-6.

Signals found at δ 70.1 were from the C-6 carbons, which were O-substituted and disappeared following Smith degradation, while unsubstituted C-6 carbons showed signals at δ 61.1 - 60.7. The signal at δ 61.1 is compared to that obtained after Smith degradation and was attributed to the free C-6 from the principal region of the 3-O-substituted glucan. The others signals at δ 60.9 and 60.7 suggested adjacent glucose residues substituted with β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl (gentiobiosyl) branches, respectively. The 3-O-substituted carbon atoms from the main chain resonated between δ 85.5 and 86.3. In the ^{13}C -NMR spectrum, the signal at δ 86.3 resonated more intensely suggesting large proportions of regions along the main glucan chain did not carry substitutions. Signals at δ 86.0 and δ 85.5 were attributed to \rightarrow 3,6)-Glc_p-(1 \rightarrow

residues, and were substituted with β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl (gentiobiosyl) residues, respectively. The signal intensities found in C-3 substituted and free C-6 regions suggest a possible random disposition of the glucosyl substituents along the chain, and will be the subject of further investigation

Methylation of the periodate-oxidised polysaccharide showed almost total disappearance of terminal units (Fig. 2B). Dimethylated units practically disappeared following Smith degradation, which removed the oxidised residues attached to the branching points. The linear (1 \rightarrow 3)- β -glucan obtained after one-cycle periodate oxidation and Smith degradation suggested the side chains constituted a single glucose residue, and also with a short-chained (1 \rightarrow 6)- β -linked glucosyl oligosaccharide. The latter constituent was confirmed by the presence of 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol¹⁷. Furthermore, ¹³C-NMR spectra of the periodate-oxidised polysaccharide showed the disappearance of the signal at δ 70.1, corresponding to a substituted C-6, and a comparison of the intensities from the signals: C-1, C-3 and C-6 (Table 1) showed a linear D-glucan exclusively carrying β (1 \rightarrow 3) linkages. A similar β -glucan produced by *Pestalotia* sp. 815 was described as having a (1 \rightarrow 3)- β -linked backbone with three out of every five glucosyl residues substituted at O-6 with either single D-glucosyl groups, or occasional short (1 \rightarrow 6)- β -linked oligosaccharides²³. Total hydrolysis of the oxidised *Botryosphaeran* released glycerol (45%), which corresponded to mono- (glucose) and oligo-saccharides (glucose- β -(1 \rightarrow 6)-glucose) branch residues, and glucose (55%) arising from (1 \rightarrow 3)- β -linked glucose and (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -linked glucose, which were not oxidised by periodate.

The partial acid-hydrolysate of *Botryosphaeran* (fraction GP-F₁) was fractionated by gel filtration on Sephadex G-15 (Fig. 3) into 3 fractions comprising modified polysaccharide (Fraction A), mixed oligosaccharides (Fraction B) and mainly glucose (Fraction C) with some

shorter oligosaccharides. Fractions B and C were analysed by HPAEC/PAD, and the former (Fig. 4) yielded a homologous series of $\beta(1\rightarrow3)$ - and $\beta(1\rightarrow6)$ -linked glucosyl-oligosaccharides; two of which were identified as gentiobiose and gentiotriose, respectively, from reference standards. Considering that Botryosphaeran (GP-F₁) was purified, and gentiotriose was detected as one of the products obtained through partial acid hydrolysis, the above evidence strongly suggests the presence of a $(1\rightarrow6)$ - β -D-glucopyranosyl disaccharide (gentiobiose) side branch.

Besides methylation evidence, side-chain/branched structure of β -glucans has also been demonstrated by specific enzymatic hydrolysis of the EPS using a fungal $(1\rightarrow3)$ - β -exo-glucanase to isolate appendage mono- and di- saccharides²², and a β -1,3-glucosidase to distinguish side-chain structure¹⁵. Additionally, such studies have revealed there was no evidence that fungal $(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ - β -glucans (e.g., epiglucan from *Epicoccum nigrum*²²) were composed of regular repeating structures as found with bacterial exopolysaccharides. They do, however, show repeated structural features. Probably the structural variations between $(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ - β -glucans are determined during fermentation by specific side-branch synthesising enzymes or through modification by hydrolytic enzymes.

From the foregoing observations, it was concluded that Botryosphaeran produced by *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5 was a $(1\rightarrow3)$ - β -D-glucan with both single $(1\rightarrow6)$ - β -D-glucopyranosyl, and β - $(1\rightarrow6)$ - β -D-di-glucopyranosyl (gentiobiose), side-branches attached along the $(1\rightarrow3)$ - β -linked D-glucosyl backbone chain at a frequency ($\sim 22\%$) of 1 branch point to every 5 glucose residues.

3. Experimental

Botryosphaeria, culture media and growth conditions.- Botryosphaeria sp. isolate MAMB-5 was maintained at 4 °C on potato-dextrose-agar¹¹. Inoculum was prepared by growing Botryosphaeria sp. on agar plates [Vogel minimum salts medium²⁴, agar (20 g/L) and glucose (10 g/L)]. After 5 days growth (28 °C), mycelial fragments were transferred to four 125 ml flasks containing 25 ml of Vogel minimum salts medium and glucose (0.5 g/L), and incubated at 28 °C for 48 h on a rotary shaker (180 rpm). The pre-cultures were then homogenised (sterilised chilled Blender) for 0.5 min at maximum speed. The cell homogenate was then centrifuged (1250 x g/10 min), the mycelium recovered, diluted with sterilised physiological saline solution to an absorbance of 0.4 to 0.5 at 400 nm, and 4 mL aliquots of the suspension used to inoculate Erlenmeyer flasks (1 L) containing 200 mL of Vogel minimum salts medium and glucose (5 g/L). Cultures were grown in submerged cultivation (180 rpm) for 72 h at 28 °C.

Preparation and dissolution of exopolysaccharide.- Cell-free extracellular fluid was obtained after removal of the mycelium by centrifugation (3000 x g/10 min) at 4 °C. The supernatant was treated with 3 volumes of absolute ethanol, and the precipitate recovered, dissolved in deionised water and extensively dialysed against frequent changes of deionised water for 48 h, then frozen and freeze-dried to obtain the crude exopolysaccharide preparation. As the freeze-dried exopolysaccharide preparation showed low solubility in water, complete dissolution was achieved by heating for 2 h at 50 °C (pH 7.0).

Analytical techniques.- Carbohydrate was determined by the phenol-sulfuric acid method of Dubois et al.²⁵ with glucose as standard. Protein was measured by the Bradford method²⁶ using bovine serum albumin as standard.

Purification of exopolysaccharide.- The exopolysaccharide preparation was dissolved in water (1 g/L) and fractionated by gel permeation chromatography on a column of Sepharose CL-4B (30 cm x 2.5 cm) eluted with water (0.8 mL/min). Fractions (3.5 mL) were collected and analysed for carbohydrate and monitored at 280 nm for protein. The void volume was determined using blue dextran. Fractions corresponding to peaks (GP-F₁ and GP-F₂) were pooled and freeze-dried.

Fraction GP-F₁ was further fractionated by ion-exchange chromatography. A sample of 1 g/L dissolved in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) was applied to a column of DEAE-Sepharose (FF) (12 cm x 1.8 cm), and developed with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) as eluent (0.4 mL/min). Fractions (1.0 mL) were collected and analysed for carbohydrate, and read at 280 nm. Fractions corresponding to peak IE-F₂ were pooled, dialysed against deionised water and freeze-dried.

Monosaccharide analysis.- Polysaccharide samples (0.050 mg) were hydrolysed in 5 M trifluoroacetic acid (0.5 mL) for 16 h/100 °C. After hydrolysis, the solution was evaporated under vacuum, and the residue dissolved in 0.5 mL of water and evaporated again. The dissolution and evaporation cycle was repeated twice. Finally, the residue was dissolved in 0.2 mL of water, and 0.025 mL aliquots used for HPAEC/PAD^{27,28} (High Performance Anionic Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection from Dionex DX 500). Neutral monosaccharides were separated isocratically (0.014 M NaOH) using a CarboPac PA-10 (Dionex Chromatography) column (4 x 250 mm) equipped with a PA-10 guard column at a flow rate of 1.0 mL/min as previously described^{28,29}. Elution conditions were produced using water (eluent 1) and 0.2 M NaOH (eluent 2). The column was regenerated, after 20 min using 100% of eluent 2 for 15 min, followed by a return to 0.014 M NaOH. Monosaccharide quantification was carried

out from peak area measurements using response factors obtained from standard monosaccharides.

Methylation – acid hydrolysis – acetylation.- GP-F₁ fraction (5 mg) was dissolved in dimethyl sulfoxide (1 mL), methylsulfinyl carbanion (0.4 mL) was added and the mixture sonicated for 20 min at ambient temperature. Methyl iodide (0.3 mL) was added gradually. The methylated polysaccharide was extracted with chloroform (4 mL), and the chloroform phase evaporated until completely dry³⁰. A second and third methylation run was performed as above. The permethylated polysaccharide was hydrolysed with 72% H₂SO₄ at room temperature for 2 h, and then water added (4 mL) and kept under reflux at 100 °C for 18 h^{31,32}. The resulting partially methylated sugars were reduced with NaBH₄, acetylated, and analysed by gas liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) on a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using He as carrier gas. A capillary column (DB-225; 15 m x 0.25 mm i.d.) was used. The injection temperature was 50 °C with a program to 220 °C (constant temperature)³³.

Smith degradation.- GP-F₁ (50 mg) was oxidised with aqueous 0.05 M NaIO₄ (50 mL) for 120 h at 4 °C in the dark³⁴. The oxidised polysaccharide was reduced with 1.0 M NaBH₄, and a portion subjected to total acid hydrolysis (0.5 M H₂SO₄, 100 °C, 5 h). Another portion was submitted to mild acid hydrolysis (1.0 M H₂SO₄, 24 h, 50 °C) to remove the residues of oxidised sugars attached to the polysaccharide chain (Smith degradation), and then neutralised, dialysed against water, freeze-dried and methylated twice as described above.

Partial acid hydrolysis.- Partial acid hydrolysis of GP-F₁ (30 mg) was performed as described by Ukai et al.³⁵ using 50% (v/v) H₂SO₄ for 16 h at 4 °C, and then stirred for 1 h at 35 °C. The hydrolysate was neutralised with Amberlite IR-400 (carbonate) resin, and the products

separated on a Sephadex G-15 column (1.0 cm x 37 cm) calibrated with starch, melibiose and glucose. Water was used as eluent (0.13 mL/min) and fractions collected were analysed for carbohydrate by the phenol-H₂SO₄ method. Fractions containing the modified poly-, oligo- and mono- saccharides were analysed by HPAEC/PAD^{36,37}. Mono- and oligo- saccharides were separated on a CarboPac PA-100 column (4 x 250 mm) and guard column (4 x 50 mm) at a flow rate of 1 mL/min. The column was equilibrated in 0.1 M NaOH (97%) and 0.5 M sodium acetate (3%). After 15 min, an acetate gradient was developed over a 60 min period to a limit of 0.25 M sodium acetate, while the concentration of NaOH remained at 0.1 M. Monosaccharides and oligosaccharides were detected by Pulsed Amperometric Detection (Dionex DX-500) without the addition of post-column alkali. Monosaccharides and oligosaccharides in the experimental samples were identified by comparing their retention times (min).

FTIR .- FTIR spectroscopy was performed using a Bruker Vector 22 Model FTIR Spectrometer on 2 mg of freeze-dried GP-F₁ in 300 mg of KBr¹⁹. Cellulose (4 mg) and starch (4 mg) in 300 mg KBr were used as standards. Scans were conducted in the range 1800 – 500 cm⁻¹ at a resolution of 2 cm⁻¹.

¹³C-NMR. – ¹³C-NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-400 NMR Spectrometer with polysaccharide solutions (15 mg/mL GP-F₁, and 5 mg/mL periodate-oxidised polysaccharide) in dimethyl sulfoxide at 400 MHz (30 °C). Chemical shifts were referred to tetramethylsilane³⁸.

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. M. Iacomini (DB-SCB-UFPR, Curitiba, PR) and Gil V.J. da Silva (DQ-FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, SP) for performing the NMR analyses, and Dr. Aldo

Job (DFQB-FCT-UNESP, Presidente Prudente, SP) for FTIR analysis. FAPESP and CAPES (Brazil), and CPG-UEL are acknowledged for financial support.

References

1. Mizuno, T.; Saito, H.; Nishitoba, T.; Kawagishi, H. *Food Rev. Int.* 1995, 11, 23-61.
2. Wasser, S.P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 60, 258-274.
3. Yang, F.C.; Liao, C.B. *Enz. Microb. Technol.* 1998, 33, 547-553.
4. Sutherland, I.W. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge University Press: NY, 1990.
5. Stone, B.A.; Clarke, A.E. *Chemistry and Biology of β -1,3-Glucans*. La Trobe University Press: Australia, 1992.
6. Bohn, J. A.; BeMiller, J. N. *Carbohydr. Polym.* 1995, 28, 3-14.
7. Corsaro, M. M.; Castro, C.; Evidente, A.; Lanzetta, R.; Molinaro, A.; Mugnai, L.; Parrilli, M.; Surico, G. *Carbohydr. Res.* 1998, 308, 349-357.
8. Rouhier, P.; Kopp, M.; Begot, V.; Bruneteau, M.; Fritig, B. *Phytochemistry* 1995, 39, 57-62.
9. Biggs, A. R. *Plant Disease* 1995, 79, 1062-1067.
10. Ramos, L. J.; Davenport, T. L.; McMillan, R. T.; Lara, S. P. *Plant Disease* 1997, 81, 509-514.
11. Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H.; St Hardy, G. E. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996, 23, 93-96
12. Dekker, R.F.H.; Vasconcelos, A-F.D.; Barbosa, A.M.; Giese, E.C.; Paccola-Meirelles, L. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 1987-1993.

13. Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. *Enz. Microb. Technol.* 2001, 28, 81-88
14. Selbmann, L.; Crognale, S.; Petruccioli, M. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 34, 51-55.
15. Selbmann, L.; Stinglele, F.; Petruccioli, M. *Ant. van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 2003, in-press.
16. Perlin, A.E.; Taber, W.A. *Can. J. Chem.*, 1963, 41, 2278-2282.
17. Serviour, R. J.; Stasinopoulos, S. T.; Auer, D. P. F.; Gibbs, P. A. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1992, 12, 279-298.
18. Krcmar, P.; Novotny, C.; Marais, M-F.; Joseleau, J-P. *Int. J. Biol. Macromol.* 24, 1999, 61-64.
19. Gutiérrez, A.; Prieto, A.; Martínez, A. T. *Carbohydr. Res.* 1996, 281, 143-154
20. Gorin, P. A. J.; Baron, M.; Corradi da Silva, M. L.; Teixeira, A. Z.; Iacomini, M. *Ciência e Cultura* 1993, 45, 27-36
21. Schweiger-Hufnagel, U.; Ono, T.; Izumi, K.; Hufnagel, P.; Morita, N.; Kaga, H.; Morita, M.; Hoshino, T.; Yumoto, I.; Matsumoto, N.; Yohida, M.; Sawada, M. T.; Okuyama, H. *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 183-187.
22. Schmid, F.; Stone, B. A.; McDougall, B. M.; Bacic, A.; Martin, K. L.; Brownlee, R. T. C.; Chai, E.; Seviour, R. J. *Carbohydr. Res.* 2001, 331, 163-171.
23. Misaki, A.; Kawaguchi, K.; Miyaji, H.; Nagae, H.; Hokkoku, S.; Kakuta, M.; Sasaki, T. *Carbohydr. Res.* 1984, 129, 209- 227.
24. Vogel, H. J. *Genetic Bull.* 1956, 13, 42-43.
25. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* 1956, 28, 350-356.
26. Bradford, M. M. *Anal Biochem.* 1976, 72, 284-54.
27. Fan, J-Q.; Namiki, Y.; Matsuoka, K.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* 1994, 219, 375-378

28. Weitzhandler, M.; Kadlecek, D.; Avdalovic, N.; Forbes, J. G.; Chow, D.; Townsend, R. R. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 5121-5130.
29. Elífió, S. L.; Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J. *New Phytol.* 2000, 148, 327-334.
30. Pazur, J. H. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*; Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F., Eds. Neutral polysaccharides. IRL Press: Oxford, 1994; 2nd Ed., pp. 73-124.
31. Bouveng, H. O.; Lindberg, B. *Meth. Carbohydr. Chem.* 1965, 5, 296-298.
32. Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Jablonski, E.; Gorin, P. A. J. *Phytochemistry* 1993, 33, 547-552.
33. Woranovicz, S. M.; Pinto, B. M.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* 1999, 51, 395-402.
34. Fabre, I.; Bruneteau, M.; Ricci, P.; Michel, G. *Eur. J. Biochem.* 1984, 142, 99-103.
35. Ukai, S.; Yokoyama, S.; Hara, C.; Kiho, T. *Carbohydr. Res.* 1982, 105, 237-245.
36. Lee, Y. C.; Rice, K. G. In: *Glycobiology: A Practical Approach*; Fukuda, M.; Kobata, A., Eds. Fractionation of glycopeptides and oligosaccharides from glycoproteins by HPLC. IRL Press: Oxford, 1993; pp. 127-164.
37. Rice, K. G.; Corradi da Silva, M. L. *J. Chromatogr. A*, 1996, 720, 235-249.
38. Gorin, P. A. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1981, 38, 12-104.

Table 1. ^{13}C -NMR spectral assignments of Botryosphaeran produced by Botryosphaeria sp. isolate MAMB-5 measured at 30 °C.

| Linked-glucose residue | Chemical shifts (δ , ppm) | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------|--------------|------|------|----------------------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
| GP-F ₁ ^a | | | | | | |
| Glc-(1→ | 103.3 | 73.8 | 75.5 | 68.8 | 76.7 | 61.1 |
| → 6)-Glc-(1→ | 102.9 | 73.0 | 74.8 | 68.7 | 76.3 | 70.1 |
| → 3)-Glc-(1→ | 103.1 | 73.0 | 86.3 | 68.7 | 76.7 | 61.1 60.9 60.7 |
| → 3,6)-Glc-(1→ | 102.9 | 73.0 | 86.0 85.5 | 68.7 | 76.3 | 70.1 |
| After Smith Degradation ^b | | | | | | |
| → 3)-Glc-(1→ | 103.1 | 73.0 | 86.3 | 68.7 | 76.7 | 61.1 |

^a EPS fraction obtained by gel permeation chromatography.

^b Periodate-oxidised GP-F₁.

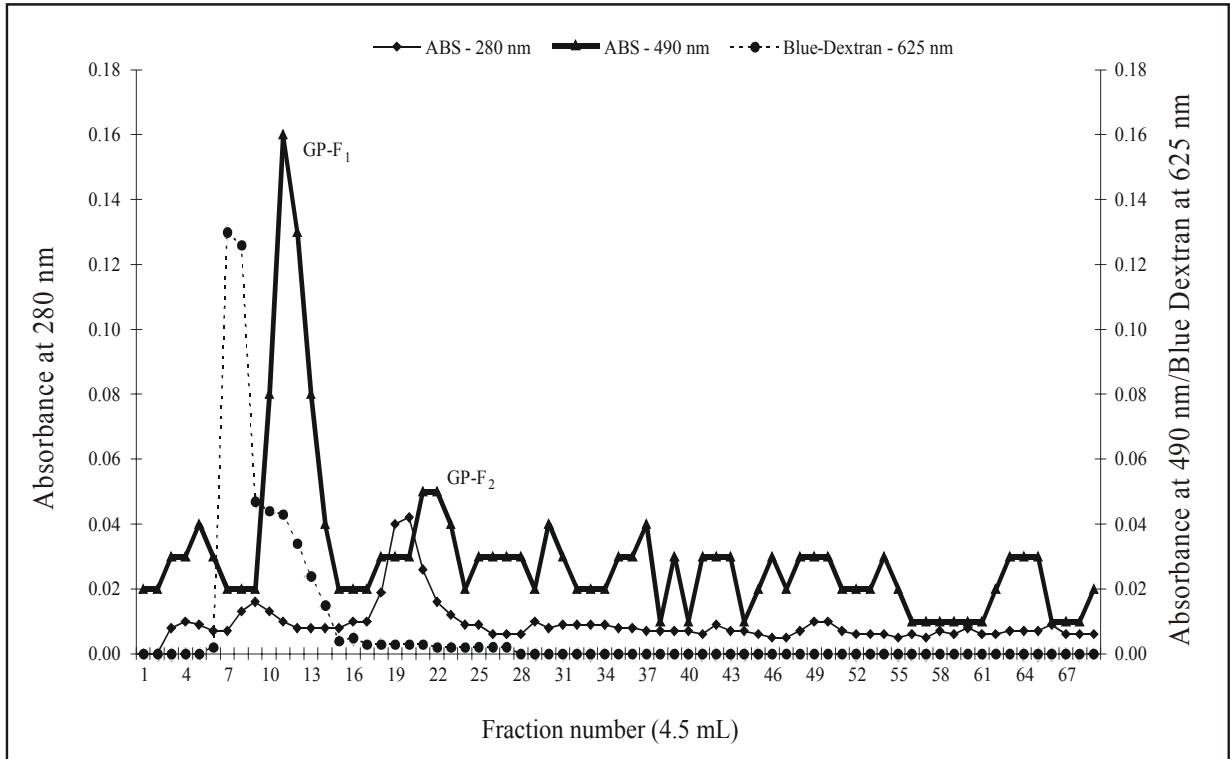
Legends to Figures

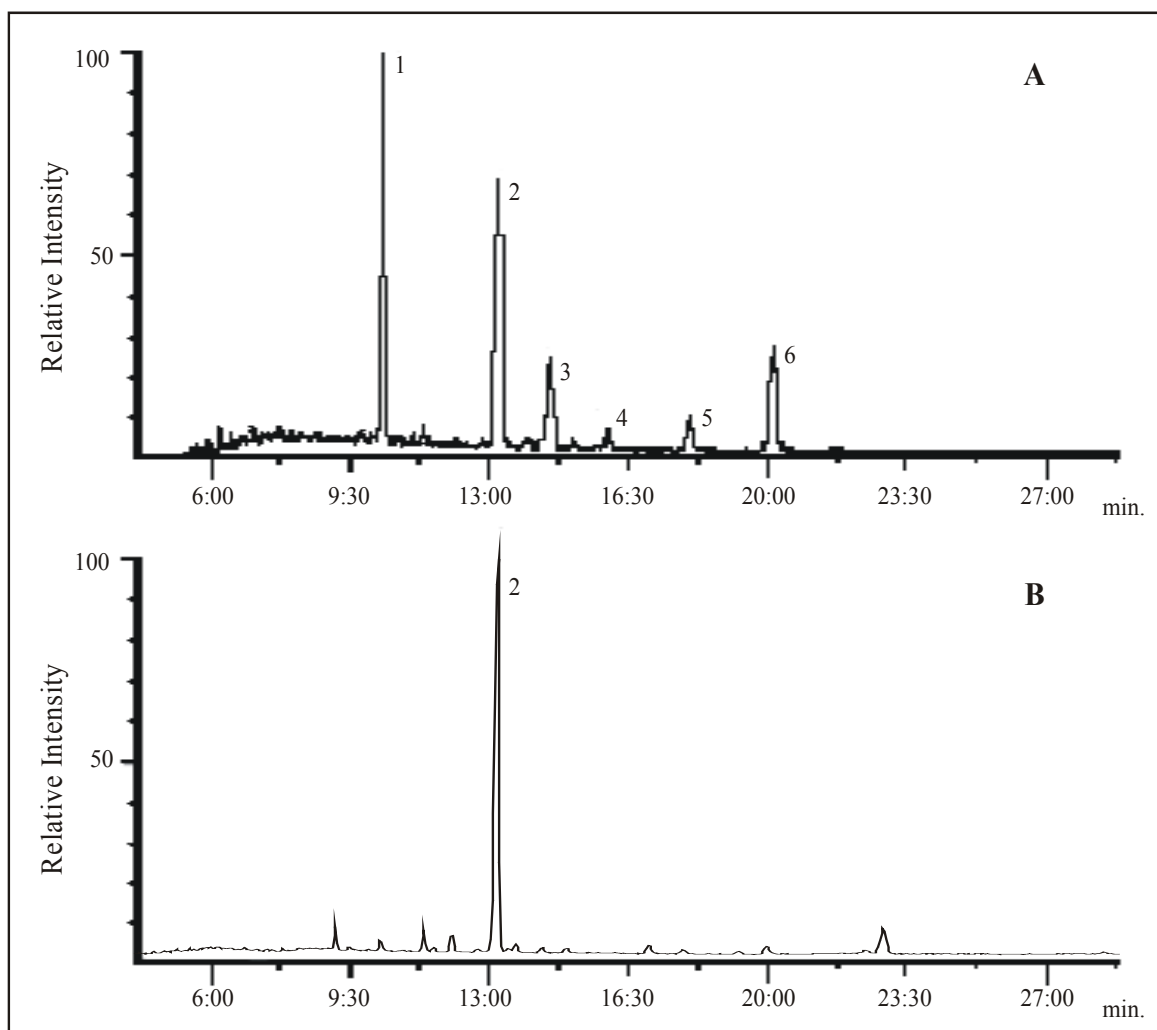
Fig. 1. Gel permeation chromatography profile of EPS from *Botryosphaeria* sp. on a column of Sepharose CL 4B. The column (2.0 cm x 30.0 cm) was eluted with water at a flow rate of 0.8 mL/min.

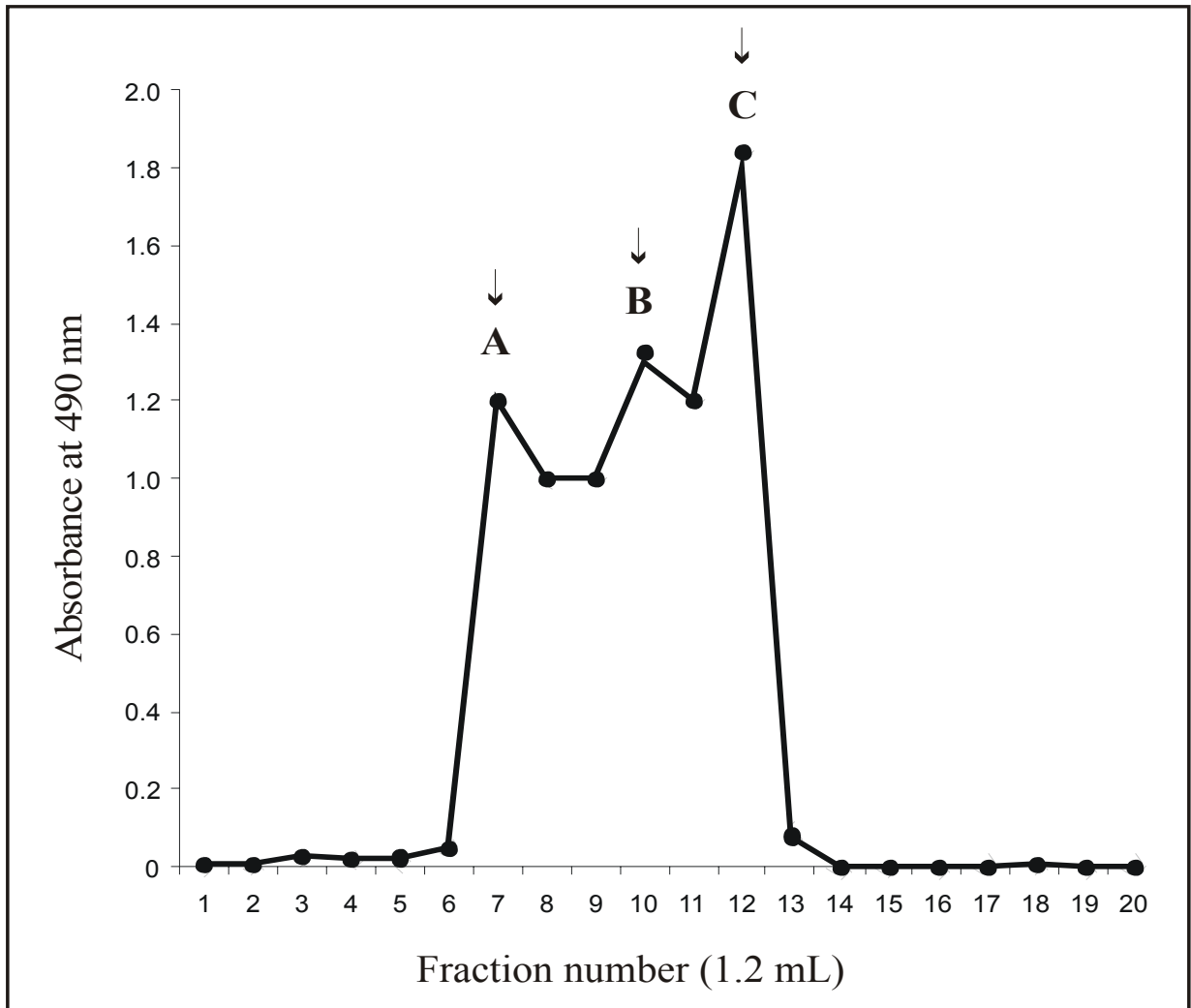
Fig. 2. Methylation analysis (GC-MS) of fraction GP-F₁ (A), and periodate-oxidised GP-F₁ (B) obtained from *Botryosphaeria* sp. Peaks: 1: 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol; 2: 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methylglucitol; 3: 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol; 4: not identified; 5: not identified and 6: 1,3,4,5-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methylglucitol.

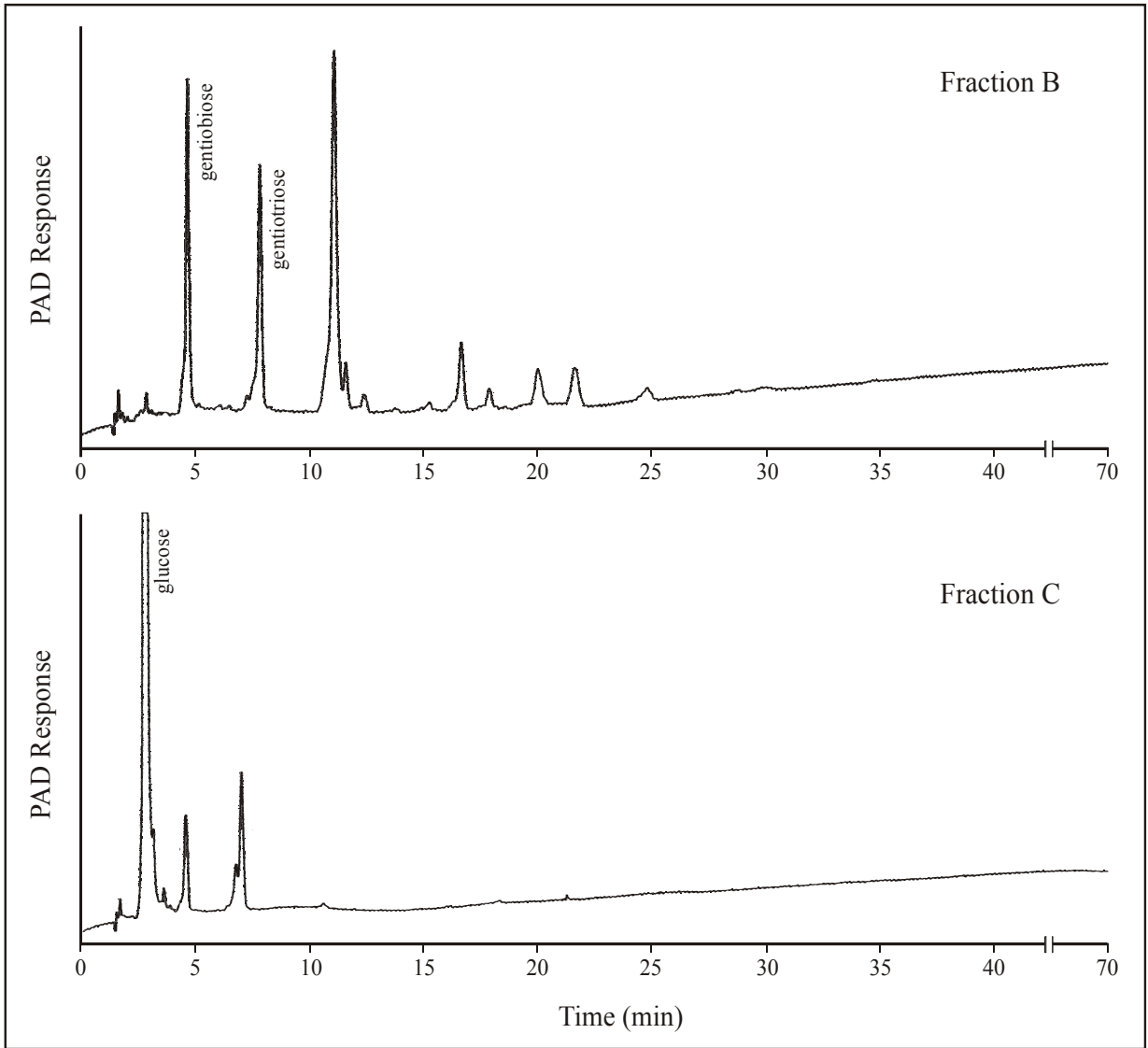
Fig.3. Gel permeation chromatography profile on Sephadex G-15 after partial hydrolysis of EPS fraction GP-F₁ obtained from *Botryosphaeria* sp. A: modified polysaccharide; B: mixed oligosaccharides, and C: shorter oligosaccharides and glucose (the arrows, from left to right correspond to the standards: starch, melibiose/sucrose/lactose and, glucose). The column (0.8 cm x 50.0 cm) was eluted with water at a flow rate of 0.13 mL/min.

Fig. 4. Analysis of fractions B and C arising from chromatography on Sephadex G-15 (Fig. 3) by HPAEC using a CarboPac PA-100 column.









ANEXO C

Instruções para preparação e encaminhamento de artigos científicos para periódicos

ANEXO C – Instruções para preparação e encaminhamento de artigos científicos para periódicos.

PERIÓDICO: JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY

Instructions to Authors

1. The journal publishes original papers, short communications, and review articles. Submission of a paper implies that it has not been published or has not been submitted for publication elsewhere. Manuscripts should be sent in duplicate with one set of the original illustrations to the Editor-in-Chief: Prof. Dr. Horst Malke, Hans-Knöll-Str. 2, D-07745 Jena.
2. Manuscripts should preferably be written in English but may also be submitted in German. They should be typed double-spaced and be accompanied by a title page comprising: name and address(es) of the institution(s) where the work was done, title of the paper, and the complete name(s) of the author(s). Each paper must begin with a brief summary in English. Original papers should be divided into sections headed: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, and References. A short title for use as running head should be provided. The exact mailing address of the author to whom correspondence, reprint requests etc. are to be sent must be indicated at the end of the paper. Manuscripts should also be submitted on a diskette containing a word-processor file with the entire text, followed by tables and figure legends.
3. Tables, including captions, and figure legends should be mounted at appropriate places into the text. Leave two blank lines before continuing with the text. The size of the illustrations should not exceed the maximum printing area of 12 | 19 cm (4.5 | 7.5 inches).
4. At the author's request multi-coloured illustrations will be reproduced. In these cases the author will be charged a fee according to the actual additional costs. For estimates of these costs please contact the Editorial Office.
5. Literature citations in the text should be by author and year of publication. If there are more than two authors, only the first one should be named, followed by et al..

References should include only publications cited in the text. They should be quoted in alphabetic order:

- Books: Family name(s) and initials of author(s), year of publication. Title of the book. Volume and edition, publisher and place of publication, e.g.: BERTHELIN, J., BELGY, G. and MAGNE, R., 1977. Some aspects of the mechanism of solubilization and insolubilization of uranium from granites by heterotrophic microorganisms. In: Bacterial Leaching Conference (W. SCHWARTZ, Editor), pp. 261-270. Verlag Chemie Weinheim.
 - Journals: Family name(s) and initials of author(s), year of publication. Title of the paper. Abbreviated name of the journal, volume (underlined), number of the first and last page, e.g.: KÇPPELI, O., MÅLLER, M. and FIECHTER, A., 1978. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacteriol.*, 133, 952-958.
6. Galley proofs will be sent to the author. It should be corrected and returned to the Editorial Office, Journal of Basic Microbiology, Kunitz, Vor dem Obertore 7, D-07751 Jena, as soon as possible.
 7. Authors will receive a complimentary copy of the issue containing their article. Reprints, further issues and a high resolution PDF can be ordered at the prices shown on the reprint order form which will be sent with the proofs. Additional instructions see cover page 3.

Assignment of Rights for Journal Contributions

With the acceptance of the manuscript for publication in Journal of Basic Microbiology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim acquires exclusively for three years from the date on which the article is published and thereafter for the full term of copyright, including any future extensions, on a non-exclusive basis all publishing rights including those of pre-publication, reprinting, translating, other forms of reproduction e.g. by photocopy, microform, or other means including machine-readable forms like CD-ROM, CD-I, DVD, diskettes, electronic storage and publishing via Local Area Networks, Intranet and Internet, and other data networks and other forms of distribution e.g. by Document Delivery-Services of this article world-wide. This

includes the right of WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim to transfer to third parties the partial or full rights. Moreover, the provisions of laws of the Federal Republic of Germany apply.

PERIÓDICO: CARBOHYDRATE RESEARCH

Guide for Authors: Carbohydrate Research

[A PDF version of the full instructions to Authors \(January 2003\), including all special characters.](#)

[Graphical abstract page.](#)

The notes shown below are a short guide for authors, the full instructions to authors are available for download as a pdf file from the link shown above.

General

Contributions to *Carbohydrate Research* may be submitted as Full Papers, Notes, and Rapid Communications and Perspectives. To be considered, articles must deal with original research. The results must not have been published or submitted for publication elsewhere, except that Full Papers may be used for complete reports of findings that were first presented in Rapid Communications or abstracts of meetings. Authors are encouraged to write in English, but articles are also published in French and German.

Preparation of Manuscripts

For illustrations of the layout of the classes of articles (Full Papers, Perspectives, Notes, and Rapid Communications), authors are earnestly encouraged to examine a current issue of the journal, e.g. the free sample copy available online <http://www.elsevier.com/locate/carres>. In addition, authors may wish to refer to "*The ACS Style Guide*" as the definitive reference for matters of editorial style.

Articles should consist of:

A graphical abstract-summarises the article in a concise pictorial form, using the template shown in the journal and in the PDF version of the instructions to authors.

A *title* - this should be concise, but specific enough to alert the readers to whom the article is directed when seen in a table of contents, database, etc.

A listing of the *author(s)* with the *address(es)* of their institutions - please provide one fully spelled-out given name (forename) for each author. The corresponding author should always be indicated by an asterisk.

An *abstract* - this should be concise and independent of the body of the paper. Full Papers in French or German should include an English version of the abstract in addition to the one in the original language.

A listing of *keywords* (typically 3-6).

The body of the *text* (including tables, charts, and figures, and a bibliography). Typically the body comprises sections labelled Introduction, Results and discussion, and Experimental, but this specific structure is not obligatory. Authors are free to vary the organization of articles as needed for optimal presentation of their subject matter.

Acknowledgments - if desired.

References - bibliographic references should be numbered in the order in which they are cited, being identified in the text by superscript Arabic numerals, and listed in a section at the end of the paper. Titles of journals should be abbreviated according to the *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI)*.

For example:

1. Borén, H. B.; Garegg, P. J.; Wallin, N.H. *Acta Chem. Scand.*, **1972**, *26*, 1082-1086. [**Inclusive pages are required**].
2. Ledrut, H. U.S. Patent 2 551 982, 1951; *Chem. Abstr.*, **1952**, *51*, 7128i. [If possible include a reference to *Chemical Abstracts*, or to the *World Patent Index* (Derwent Publishers).]
3. Wolfrom, M.L.; Szarek, W.A. Halogen Derivatives. In *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed; Pigman, W., Horton, D., Eds; Academic Press: New York, 1972; Vol. 1A, pp239-251.

Unpublished material: Papers that have been accepted but not yet published may be listed in the References section as "in press". Personal communications, manuscripts in preparation or submitted but not yet accepted, and "unpublished data" may also be listed in this section.

The References section should not be used for non-bibliographic comments, which ideally should be included in the text but, if absolutely necessary, may be treated as *footnotes*.

Chemical and Biochemical Nomenclature

The nomenclature of all carbohydrates and glycoconjugates should follow the recommendations of the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature: "Nomenclature of

Carbohydrates (Recommendations 1996)" published in *Pure Appl. Chem.*, **1996**, *68*, 1919-2008 as well as *Carbohydr. Res.* **1997**, *297*, 1-92 and elsewhere, including the World-Wide Web at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/>.

For any enzyme having a substantial role in an article, the EC number should be cited when the enzyme is first mentioned. A complete and definitive list of EC numbers, which updates the printed version (*Enzyme Nomenclature*, Academic Press, 1992), can be found on the World-Wide Web at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

Title Compounds

3.1.1. Methyl 6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-allopyranoside (4).

Note that the (numbered) compound is an example of a *title compound*, which should satisfy certain criteria if it is to be listed this way. Convincing evidence for identity and purity must be presented for all new carbohydrate derivatives listed as *title compounds*. Ordinarily, identity is established by NMR and mass spectral data. As evidence of purity authors are required to include an elemental (combustion) analysis (minimally C and H), with values deviating from the theoretical not more than $\pm 0.4\%$ absolute. When a C and H analysis is not feasible (e.g. very small amounts of material available) the criteria used to assess purity should be specified; these should include NMR observations (absence of extraneous lines in a spectrum run at high sensitivity) and chromatographic data (GLC, HPLC, or TLC at high sensitivity). Also desirable are *m/z* values from mass spectra.

It is not expected that all the intermediates in a synthetic sequence will be purified to the point of giving satisfactory elemental analyses. Many compounds will be used in a subsequent step without being refined to ultimate purity. However, the description of the preparation of such compounds should be consolidated with the description of the next title compound in the series.

Listing of Physical Data

The preferred order is: mp (if applicable); $[\alpha]_D$ (normally required for chiral compounds); R_f values (if pertinent); electronic-spectral data (UV, IR, if recorded); NMR data (if not presented in a table); MS. Note the use of semicolons to separate the successive items, and the use of ACS-approved abbreviations (see *ACS Style Guide*). Elemental analysis results follow the last spectral data, *in the same paragraph*. Use the following format: Anal. Calcd for C₁₃H₁₇BrO₈S: C, 37.78; H, 4.15; Br, 19.34; S, 7.76. Found: C, 37.86; H, 4.13; Br, 19.45; S, 7.84. Note the arrangement of element symbols in the molecular formula: C, H, then the remaining symbols in alphabetical order.

NMR data - Authors are encouraged to use tables for the presentation of NMR data. For listings as running text please adhere to the following format: ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.86 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 6.7, $J_{4,5}$ 10.7 Hz, H-4),

Tables and Figures

These should be so constructed as to be intelligible without reference to the text. Every table should have a heading, as should every column in a table. Every figure should have a caption (which should be provided on a separate page from the figure). Where the figure is a graph all axes should be labelled and provided with a scale if appropriate. All graphics must be labeled with the figure or scheme number and the corresponding author's name (either on the back if submitted on paper or with a clear file name if using online submission).

Figures should be submitted in a form suitable for direct reproduction. They should be provided as carefully prepared black line drawings on a plain white background. Charts and drawings produced by computer must be prepared at a resolution of 300 dpi or better. All graphics (including chemical structures) must be supplied camera-ready, for reproduction at single or double column width (83mm or 176mm, respectively). Authors should take particular care to ensure that lettering on a figure will remain legible after reduction.

Formula charts and Schemes

Particular attention should be paid to current conventions for drawing sugar ring structures (tapered thickening of forward edges, etc.). Structural formulas should be grouped for insertion in the text at appropriate points. Such groups need not have a caption, but those showing reaction sequences (i.e. containing arrows) may be designated Scheme 1, Scheme 2, etc. In charts and schemes formula numbers must follow in sequence across the page, except where a single structure with R groups represents two or more compounds. The sequence then follows the listing below the structure, which should be in "tabular" format.

Submission of Manuscripts

Carbohydrate Research manuscripts can be submitted by mail (post) or by using the new online submission system.

Mailing of manuscripts

The initial submission should consist of quadruplicate paper copies; after refereeing is complete and any necessary changes have been incorporated, the final (revised) copy should be furnished on floppy disk, CD or SyQuest with two paper copies. Please label all disks with "Carbohydrate Research", your name, software, hardware used and file names with the correct extension (e.g. Fig1.cdx, tbl1-6.xls). Save text on a separate disk from the graphics, include the text and tables in one file, and provide graphics and structures in separate numbered files. Most formatting codes will be removed or replaced on processing your article, so there is no need for you to use excessive layout styling. Please do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. It is essential that the electronic and hardcopy versions are **identical**. The hardcopy will be used as the definitive version of the article.

Paper manuscripts should be sent to one of the Editors:

D.C. Baker, Department of Chemistry, The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-1600, USA.

J. Defaye, Département de Pharmacochemie Moléculaire/Glucides, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, BP 138, F-38243 Meylan Cédex, France.

D. Horton, Department of Chemistry, The American University, 4400 Massachusetts Ave., N.W., Washington, DC 20016-8014, USA.

E.F. Hounsell, School of Biological & Chemical Sciences, Birkbeck University of London, Malet Street, London, WC1E 7HX, UK.

T. Lowary, Department of Chemistry, The University of Alberta, E5-52A Gunning-Lemieux Chemistry Centre, Edmonton, AB, T6G 2G2, Canada.

Online submission

Manuscripts can be submitted using the online submission and review environment. Authors are required to go to the website and upload their article and its associated artwork. A PDF file is generated, and the reviewing process is carried out using that PDF. All correspondence between Editor and author is performed by e-mail. Authors are, however, legally obliged to sign and return a physical transfer of copyright form by conventional mail. In their electronic version, authors are requested to follow the guidelines for submitting disks. The submission site and full instructions can be found at <http://www.elsevier.com/locate/carres>. The paper should be submitted as a single file, prepared with a standard word-processor such as Microsoft Word, with embedded tables and graphics. Please note that any embedded graphics must also be submitted as separate, original files. The preferred formats for graphics files are tiff or postscript (.eps or .ps).

Book reviews - Books suitable for review in the "Book reviews" section should be sent to Professor D. Horton at the address given above.

Proofs, Offprints

Proofs: One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

As soon as proofs have been approved, they are published online as an "Article in Press" on the *Carbohydrate Research* page on ScienceDirect (www.sciencedirect.com). "Articles in Press" take full advantage of the enhanced ScienceDirect functionality, including the ability to be cited using their DOI article identifier. When the final article is assigned to an issue of the journal, the "Article in Press" version is removed and will appear in the associated online journal issue.

Offprints: Twenty-five offprints will be supplied to the corresponding author free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. This order form should be returned promptly since the price of offprints ordered *after* publication is substantially higher and will incur a 50% surcharge.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provide.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier Science has preprinted forms for use by authors in these cases: contact ES Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

ANEXO D

**O anexo D refere-se à cópia do artigo 2, publicado no periódico Carbohydrate
Research**

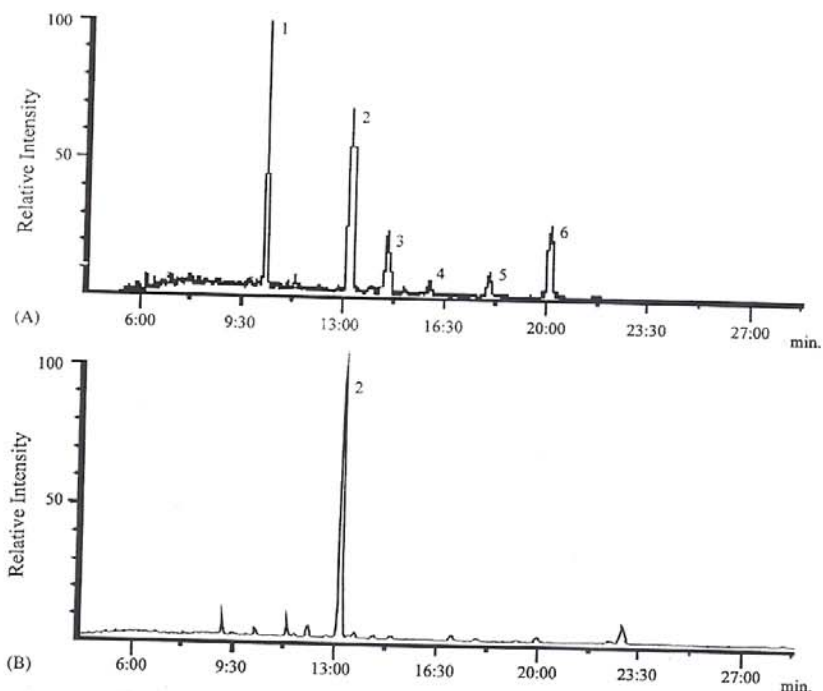


Fig. 2. Methylation analysis (GC-MS) of fraction GP-F₁ (A), and periodate-oxidised GP-F₁ (B) obtained from *Botryosphaeria* sp. Peaks: 1: 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylglucitol; 2: 1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methylglucitol; 3: 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylglucitol; 4: not identified; 5: not identified; and 6: 1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methylglucitol.

104.0 ppm. Peaks were only visible between δ 103.3 and 102.9 ppm, strongly indicating that only β -anomeric carbons were present. Evidence supporting β -anomeric carbons in the EPS was confirmed by FTIR spectroscopy (data not presented), with bands at 890/cm being typical of (1 \rightarrow 3)- β -glucans,²² and that at 1370/cm being characteristic of β -glucans.¹⁹

The signal at δ 103.1 was attributed to 3-*O* substituted glucose anomeric carbon and compared with the signal at C-1 of the residual linear polysaccharide obtained after Smith degradation (Table 1). A general rule for β -anomeric carbon glycosylation explains that there is an upfield chemical shift; in the case of *Botryosphaeran*, this is shown by a signal at δ 102.9, which is

Table 1
¹³C NMR spectral assignments of *Botryosphaeran* produced by *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5 measured at 30 °C.

| Linked-glucose residue | Chemical shifts (δ , ppm) | | | | | |
|---|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
| GP-F ₁ ^a | | | | | | |
| Glc _p -(1 \rightarrow | | | | | | |
| \rightarrow 6)-Glc _p -(1 \rightarrow | 103.3 | 73.8 | 75.5 | 68.8 | 76.7 | 61.1 |
| \rightarrow 3)-Glc _p -(1 \rightarrow | 102.9 | 73.0 | 74.8 | 68.7 | 76.3 | 70.1 |
| | 103.1 | 73.0 | 86.3 | 68.7 | 76.7 | 61.1 |
| | | | | | | 60.9 |
| \rightarrow 3,6)-Glc _p -(1 \rightarrow | 102.9 | 73.0 | 86.0 | 68.7 | 76.3 | 60.7 |
| | | | 85.5 | | | 70.1 |
| After Smith degradation ^b | | | | | | |
| \rightarrow 3)-Glc _p -(1 \rightarrow | 103.1 | 73.0 | 86.3 | 68.7 | 76.7 | 61.1 |

^a EPS fraction obtained by gel permeation chromatography.

^b Periodate-oxidised GP-F₁.

larke,⁵ and their structure-function activity reviewed.^{2,6} Fungal (1→3)- β -glucans are also known to act as phytotoxic agents causing plant diseases,⁷ but can also prevent diseases in plants as viral inhibitors.⁸

Fungi belonging to the genus *Botryosphaeria* are well recognised as plant pathogens causing various diseases in plants of commercial importance, including storage spots in preharvested fruits.^{9,10} *Botryosphaeria* has been demonstrated as ligninolytic,¹¹ producing enzymes degrading the lignified plant cell wall.¹² The fungus was reported to produce an EPS tentatively identified as a β -glucan.¹³ EPS may be linked directly to the pathogenicity of the fungus, and in woody plants could cause plant vessel blockage through 'gumming' resulting in limb dieback diseases. An EPS from *Botryosphaeria rhodina* was recently reported.^{14,15} In the present study, we report on the structural characterization of Botryosphaeran, the exopolysaccharide secreted by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5.

2. Results and discussion

2.1. Analysis and polysaccharide fractionation

The amount of the exopolysaccharide, Botryosphaeran, produced under the culture conditions was 1.7 g/L. The crude EPS freeze-dried preparation contained 86% carbohydrate and 14% protein. Acid hydrolysis showed glucose as the main monosaccharide (98%) with traces

of mannose and glucosamine also being present; both probably associated with a glycoprotein. Gel permeation chromatography of the EPS showed two fractions, GP-F₁ and GP-F₂, both eluting after the column void volume (Fig. 1), with GP-F₁ containing the higher proportion of carbohydrate (96%; 4% protein). When this fraction was subjected to DEAE-Sepharose chromatography, the resulting principal fraction (IE-F₂) showed only a minor difference in carbohydrate content (97%; 3% protein) compared to GP-F₁. Its high viscosity prevented obtaining large amounts of fraction IE-F₂, consequently GP-F₁ was chosen as suitable for structural characterization.

Methylation analysis of GP-F₁ (Fig. 2A) showed 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-glucose, 2,4,6-tri-*O*-methyl-glucose, 2,3,4-tri-*O*-methyl-glucose, and 2,4-di-*O*-methyl glucose as the main methylated sugar derivatives in the relative molar proportion of 26:36:16:22, respectively. This demonstrated that the exopolysaccharide was a glucan consisting of a (1→3)-linked glucosyl backbone substituted with approx 22% branch points of C-6. These results were in agreement with other similar β -glucans produced by fungi^{16–19} and lichens.²⁰

¹³C NMR studies showed that all carbon lines were resolved and the chemical shifts (Table 1) were in accordance with values reported in the literature.^{19,20} The ¹³C NMR data did not reveal peaks corresponding to the α -configuration of the anomeric carbon; α -glucose anomeric carbons resonate at approx δ 100.0 ppm, and anomeric β -glucose carbons²¹ slightly downfield at δ

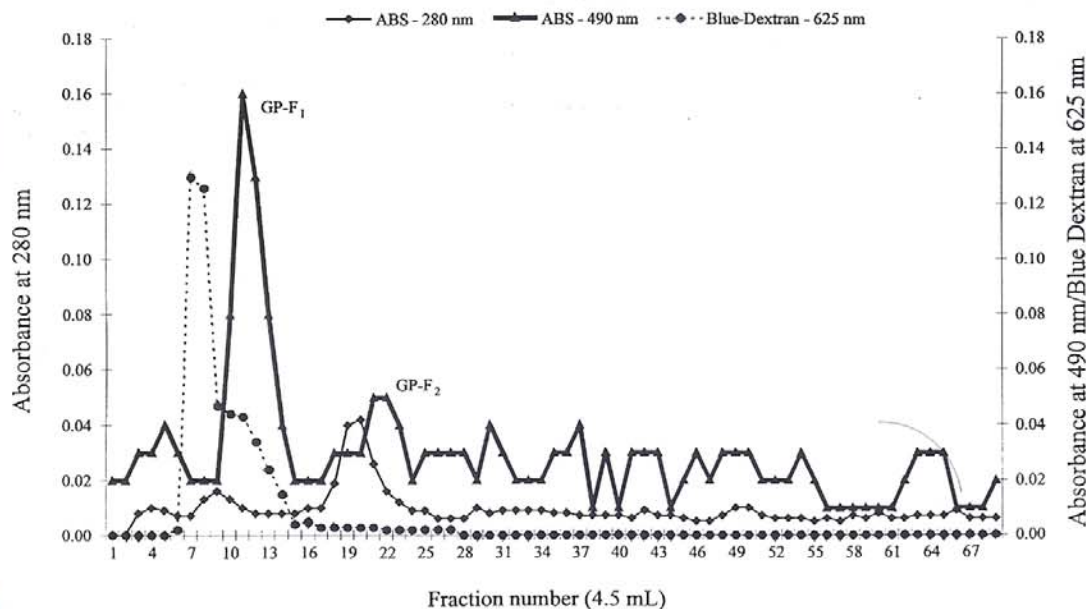


Fig. 1. Gel permeation chromatography profile of EPS from *Botryosphaeria* sp. on a column of Sepharose CL 4B. The column (2.0 × 30.0 cm) was eluted with water at a flow rate of 0.8 mL/min.

attributable to 3-O-substituted glucose units of the main chain containing branched residues (β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl; gentiobiosyl) at C-6.

Signals found at δ 70.1 were from the C-6 carbons, which were O-substituted and disappeared following Smith degradation, while unsubstituted C-6 carbons showed signals at δ 61.1–60.7. The signal at δ 61.1 was compared to that obtained after Smith degradation and was attributed to the free C-6 from the principal region of the 3-O-substituted glucan. The others signals at δ 60.9 and 60.7 suggested adjacent glucose residues substituted with β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl (gentiobiosyl) branches, respectively. The 3-O-substituted carbon atoms from the main chain resonated between δ 85.5 and 86.3. In the ^{13}C NMR spectrum, the signal at δ 86.3 resonated more intensely suggesting that large proportions of regions along the main glucan chain did not carry substitutions. Signals at δ 86.0 and 85.5 were attributed to $\rightarrow 3,6$ -GlcP-(1 \rightarrow) residues, and were substituted with β -glucopyranosyl and β -diglucopyranosyl (gentiobiosyl) residues, respectively. The signal intensities found in C-3 substituted and free C-6 regions suggest a possible random disposition of the glucosyl substituents along the chain, and will be the subject of further investigation

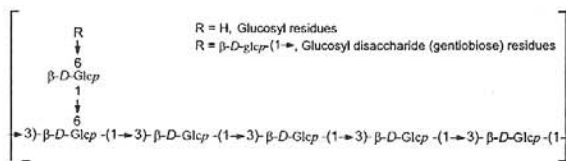
Methylation of the periodate-oxidised polysaccharide showed almost total disappearance of terminal units (Fig. 2B). Dimethylated units practically disappeared following Smith degradation, which removed the oxidised residues attached to the branching points. The linear (1 \rightarrow 3)- β -glucan obtained after one-cycle periodate oxidation and Smith degradation suggested that the side chains was constituted of a single glucose residue, and also of a short-chain (1 \rightarrow 6)- β -linked glucosyl oligosaccharide. The latter constituent was confirmed by the presence of 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylglucitol.¹⁷ Furthermore, ^{13}C NMR spectra of the periodate-oxidised polysaccharide showed the disappearance of the signal at δ 70.1, corresponding to a substituted C-6, and a comparison of the intensities from the signals: C-1, C-3 and C-6 (Table 1) showed a linear D-glucan exclusively carrying β -(1 \rightarrow 3) linkages. A similar β -glucan produced by *Pestalotia* sp. 815 was described as having a (1 \rightarrow 3)- β -linked backbone with three out of every five glucosyl residues substituted at O-6 with either single D-glucosyl groups, or occasional short (1 \rightarrow 6)- β -linked oligosaccharides.²³ Total hydrolysis of the oxidised Botryosphaeran released glycerol (45%), which corresponded to mono- (glucose) and oligo-saccharides (glucose- β -(1 \rightarrow 6)-glucose) branch residues, and glucose (55%) arising from (1 \rightarrow 3)- β -linked glucose and (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -linked glucose, which were not oxidised by periodate.

The partial acid-hydrolysate of Botryosphaeran (fraction GP-F₁) was fractionated by gel filtration on Sephadex G-15 (Fig. 3) into three fractions comprising

modified polysaccharide (Fraction A), mixed oligosaccharides (Fraction B) and mainly glucose (Fraction C) with some shorter oligosaccharides. Fractions B and C were analysed by HPAEC/PAD, and the former (Fig. 4) yielded a homologous series of β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 6)-linked glucosyl-oligosaccharides; two of which were identified as gentiobiose and gentiotriose, respectively, from reference standards. Considering that Botryosphaeran (GP-F₁) was purified, and gentiotriose was detected as one of the products obtained through partial acid hydrolysis, the above evidence strongly suggests the presence of a (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl disaccharide (gentiobiose) side branch.

Besides methylation evidence, side-chain/branched structure of β -glucans has also been demonstrated by specific enzymatic hydrolysis of the EPS using a fungal (1 \rightarrow 3)- β -exoglucanase to isolate appendage mono- and disaccharides,²¹ and a β -1,3-glucosidase to distinguish side-chain structure.¹⁵ Additionally, such studies have revealed there was no evidence that fungal (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -glucans (e.g., epiglucan from *Epicoccum nigrum*²¹) were composed of regular repeating structures as found with bacterial EPS. They do, however, show repeated structural features. Probably the structural variations between (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -glucans are determined during fermentation by specific side-branch synthesising enzymes or through modification by hydrolytic enzymes.

From the foregoing observations, it was concluded that Botryosphaeran produced by *Botryosphaeria* sp. isolate MAMB-5 was a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan with both single (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl, and β -(1 \rightarrow 6)- β -D-diglucopyranosyl (gentiobiose), side-branches attached along the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucosyl backbone chain at a frequency (approx 22%) of 1 branch point to every 5 glucose residues (Scheme 1).



Scheme 1.

3. Experimental

3.1. Botryosphaeria, culture media and growth conditions

Botryosphaeria sp. isolate MAMB-5 was maintained at 4 °C on potato-dextrose-agar.¹¹ The inoculum was prepared by growing *Botryosphaeria* sp. on agar plates [Vogel minimum salts medium,²⁴ agar (20 g/L) and glucose (10 g/L)]. After 5 days growth (28 °C), mycelial fragments were transferred to four 125 mL flasks containing 25 mL of Vogel minimum salts medium

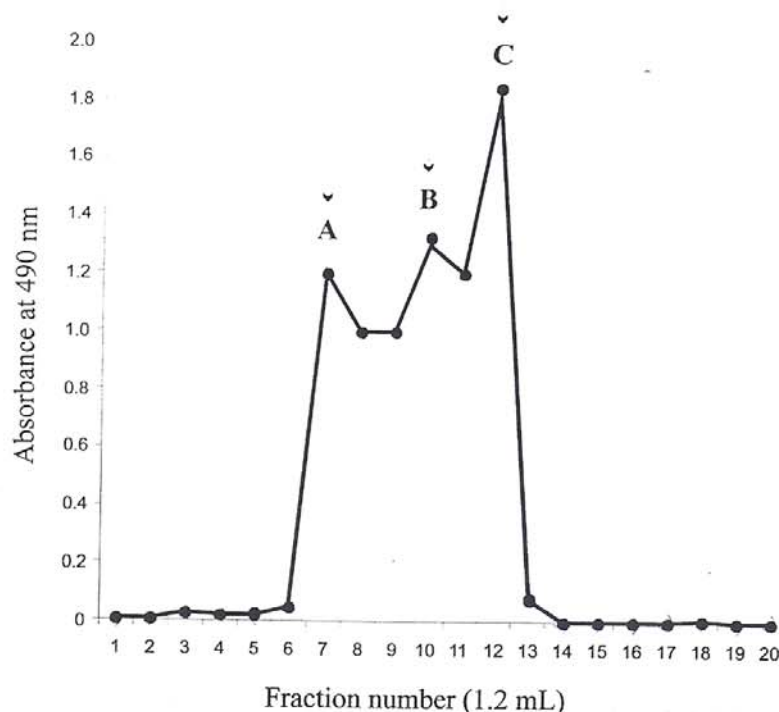


Fig. 3. Gel permeation chromatography profile on Sephadex G-15 after partial hydrolysis of EPS fraction GP-F₁ obtained from *Botryosphaeria* sp. A: modified polysaccharide; B: mixed oligosaccharides; and C: shorter oligosaccharides and glucose (the arrows, from left to right correspond to the standards: starch, melibiose/sucrose/lactose and, glucose). The column (0.8 × 50.0 cm) was eluted with water at a flow rate of 0.13 mL/min.

and glucose (0.5 g/L), and incubated at 28 °C for 48 h on a rotary shaker (180 rpm). The pre-cultures were then homogenised (sterilised chilled Blender) for 0.5 min at maximum speed. The cell homogenate was then centrifuged (1250g/10 min), the mycelium recovered, diluted with sterilised physiological saline solution to an absorbance of 0.4–0.5 at 400 nm, and 4 mL aliquots of the suspension used to inoculate Erlenmeyer flasks (1 L) containing 200 mL of Vogel minimum salts medium and glucose (5 g/L). Cultures were grown in submerged cultivation (180 rpm) for 72 h at 28 °C.

3.2. Preparation and dissolution of the exopolysaccharide

Cell-free extracellular fluid was obtained after removal of the mycelium by centrifugation (3000g/10 min) at 4 °C. The supernatant was treated with 3 vol of absolute ethanol, and the precipitate recovered, dissolved in deionised water and extensively dialysed against frequent changes of deionised water for 48 h, then frozen and freeze-dried to obtain the crude exopolysaccharide preparation. As the freeze-dried exopolysaccharide preparation showed low solubility in water, complete

dissolution was achieved by heating for 2 h at 50 °C (pH 7.0).

3.3. Analytical techniques

Carbohydrate was determined by the phenol–sulfuric acid method of Dubois co-workers²⁵ with glucose as standard. Protein was measured by the Bradford method²⁶ using bovine serum albumin as standard.

3.4. Purification of the exopolysaccharide

The exopolysaccharide preparation was dissolved in water (1 g/L) and fractionated by gel permeation chromatography on a column of Sepharose CL-4B (30 × 2.5 cm) eluted with water (0.8 mL/min). Fractions (3.5 mL) were collected and analysed for carbohydrate and monitored at 280 nm for protein. The void volume was determined using blue dextran. Fractions corresponding to peaks (GP-F₁ and GP-F₂) were pooled and freeze-dried.

Fraction GP-F₁ was further fractionated by ion-exchange chromatography. A sample of 1 g/L dissolved in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) was applied

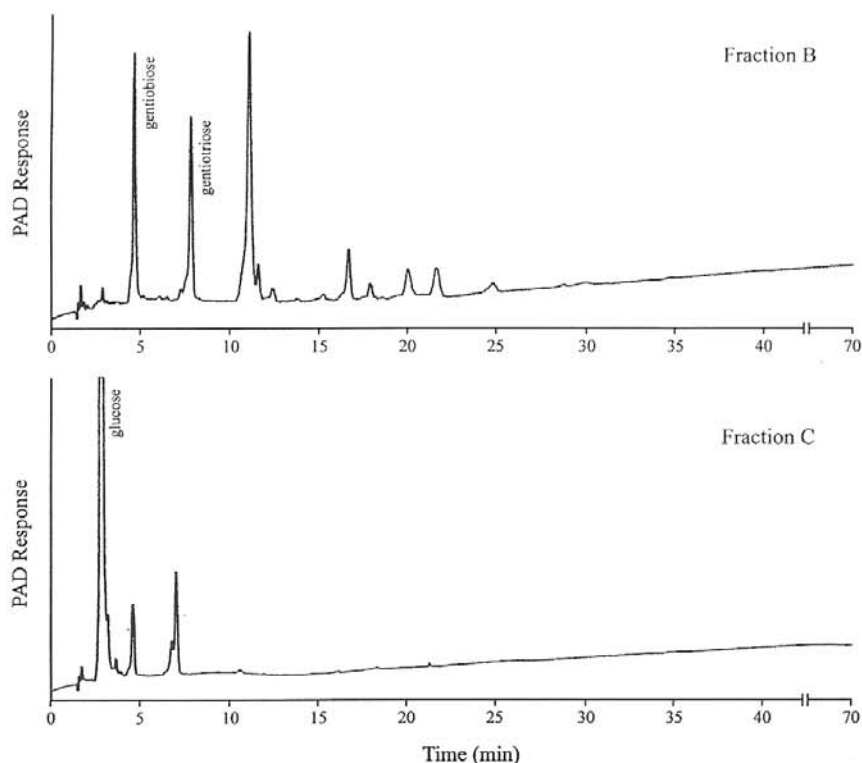


Fig. 4. Analysis of fractions B and C arising from chromatography on Sephadex G-15 (Fig. 3) by HPAEC using a CarboPac PA-100 column.

to a column of DEAE-Sepharose (FF) (12×1.8 cm), and developed with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) as eluent (0.4 mL/min). Fractions (1.0 mL) were collected and analysed for carbohydrate, and read at 280 nm. Fractions corresponding to peak IE-F₂ were pooled, dialysed against deionised water and freeze-dried.

3.5. Monosaccharide analysis

Polysaccharide samples (0.050 mg) were hydrolysed in 5 M trifluoroacetic acid (0.5 mL) for 16 h/100 °C. After hydrolysis, the solution was evaporated under diminished pressure and the residue dissolved in 0.5 mL of water and evaporated again. The dissolution and evaporation cycle was repeated twice. Finally, the residue was dissolved in 0.2 mL of water, and 0.025 mL aliquots used for HPAEC/PAD^{27,28} (High Performance Anionic Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection from Dionex DX 500). Neutral monosaccharides were separated isocratically (0.014 M NaOH) using a CarboPac PA-10 (Dionex Chromatography) column (4 × 250 mm) equipped with a PA-10

guard column at a flow rate of 1.0 mL/min as previously described.^{28,29} Elution conditions were produced using water (eluent 1) and 0.2 M NaOH (eluent 2). The column was regenerated, after 20 min using 100% of eluent 2 for 15 min, followed by a return to 0.014 M NaOH. Monosaccharide quantification was carried out from peak area measurements using response factors obtained from standard monosaccharides.

3.6. Methylation–acid hydrolysis–acetylation

GP-F₁ Fraction (5 mg) was dissolved in Me₂SO (1 mL), methylsulfinyl carbanion (0.4 mL) was added and the mixture sonicated for 20 min at ambient temperature. Methyl iodide (0.3 mL) was added gradually. The methylated polysaccharide was extracted with CHCl₃ (4 mL), and the chloroform phase evaporated until completely dry.³⁰ A second and third methylation run was performed as above. The permethylated polysaccharide was hydrolysed with 72% H₂SO₄ at room temperature for 2 h, and then water added (4 mL) and kept under reflux at 100 °C for 18 h.^{31,32} The resulting partially methylated sugars were reduced with NaBH₄,

acetylated, and analysed by gas liquid chromatography–mass spectrometry (GC–MS) on a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using He as carrier gas. A capillary column (DB-225; 15 m × 0.25 mm i.d.) was used. The injection temperature was 50 °C with a program to 220 °C (constant temperature).³³

3.7. Smith degradation

GP-F₁ (50 mg) was oxidised with aqueous 0.05 M NaIO₄ (50 mL) for 120 h at 4 °C in the dark.³⁴ The oxidised polysaccharide was reduced with 1.0 M NaBH₄, and a portion subjected to total acid hydrolysis (0.5 M H₂SO₄, 100 °C, 5 h). Another portion was submitted to mild acid hydrolysis (1.0 M H₂SO₄, 24 h, 50 °C) to remove the residues of oxidised sugars attached to the polysaccharide chain (Smith degradation), and then neutralised, dialysed against water, freeze-dried and methylated twice as described above.

3.8. Partial acid hydrolysis

Partial acid hydrolysis of GP-F₁ (30 mg) was performed as described by Ukai co-workers³⁵ using 50% (v/v) H₂SO₄ for 16 h at 4 °C, and then stirred for 1 h at 35 °C. The hydrolysate was neutralised with Amberlite IR-400 (carbonate) resin, and the products separated on a Sephadex G-15 column (1.0 × 37 cm) calibrated with starch, melibiose and glucose. Water was used as eluent (0.13 mL/min) and fractions collected were analysed for carbohydrate by the phenol–H₂SO₄ method. Fractions containing the modified poly-, oligo- and mono-saccharides were analysed by HPAEC/PAD.^{36,37} Mono- and oligo-saccharides were separated on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) and guard column (4 × 50 mm) at a flow rate of 1 mL/min. The column was equilibrated in 0.1 M NaOH (97%) and 0.5 M AcONa (3%). After 15 min, an acetate gradient was developed over a 60 min period to a limit of 0.25 M AcONa, while the concentration of NaOH remained at 0.1 M. Mono- and oligo-saccharides were detected by Pulsed Amperometric Detection (Dionex DX-500) without the addition of post-column alkali. Mono- and oligosaccharides in the experimental samples were identified by comparing their retention times (min).

3.9. FTIR

FTIR spectroscopy was performed using a Bruker Vector 22 Model FTIR Spectrometer on 2 mg of freeze-dried GP-F₁ in 300 mg of KBr.¹⁹ Cellulose (4 mg) and starch (4 mg) in 300 mg KBr were used as standards. Scans were conducted in the range 1800–500/cm at a resolution of 2/cm.

3.10. ¹³C NMR

¹³C NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-400 NMR Spectrometer with polysaccharide solutions (15 mg/mL GP-F₁, and 5 mg/mL periodate-oxidised polysaccharide) in Me₂SO at 400 MHz (30 °C). Chemical shifts were referred to tetramethylsilane.³⁸

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs M. Iacomini (DB-SCB-UFPR, Curitiba, PR) and Gil V.J. da Silva (DQ-FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, SP) for performing the NMR analyses, and Dr Aldo Job (DFQB-FCT-UNESP, Presidente Prudente, SP) for FTIR analysis. FAPESP and CAPES (Brazil), and CPG-Uel are acknowledged for financial support.

References

- Mizuno, T.; Saito, H.; Nishitoba, T.; Kawagishi, H. *Food Rev. Int.* **1995**, *11*, 23–61.
- Wasser, S. P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 258–274.
- Yang, F. C.; Liao, C. B. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *33*, 547–553.
- Sutherland, I. W. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*; Cambridge University Press: NY, 1990.
- Stone, B. A.; Clarke, A. E. *Chemistry and Biology of β-1,3-Glucans*; La Trobe University Press: Australia, 1992.
- Bohn, J. A.; BeMiller, J. N. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *28*, 3–14.
- Corsaro, M. M.; Castro, C.; Evidente, A.; Lanzetta, R.; Molinaro, A.; Mugnai, L.; Parrilli, M.; Surico, G. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 349–357.
- Rouhier, P.; Kopp, M.; Begot, V.; Bruneteau, M.; Fritig, B. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 57–62.
- Biggs, A. R. *Plant Dis.* **1995**, *79*, 1062–1067.
- Ramos, L. J.; Davenport, T. L.; McMillan, R. T.; Lara, S. P. *Plant Dis.* **1997**, *81*, 509–514.
- Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H.; St Hardy, G. E. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 93–96.
- Dekker, R. F. H.; Vasconcelos, A.-F. D.; Barbosa, A. M.; Giese, E. C.; Paccola-Meirelles, L. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1987–1993.
- Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 81–88.
- Selbmann, L.; Crognale, S.; Petruccioli, M. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *34*, 51–55.
- Selbmann, L.; Stingle, F.; Petruccioli, M. *Ant. van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **2003**, in press.
- Perlin, A. E.; Taber, W. A. *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 2278–2282.
- Serviour, R. J.; Stasinopoulos, S. T.; Auer, D. P. F.; Gibbs, P. A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1992**, *12*, 279–298.
- Kremer, P.; Novotny, C.; Marais, M.-F.; Joseleau, J.-P. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 61–64.

19. Gutiérrez, A.; Prieto, A.; Martínez, A. T. *Carbohydr. Res.* **1996**, *281*, 143–154.
20. Gorin, P. A. J.; Baron, M.; Corradi da Silva, M. L.; Teixeira, A. Z.; Iacomini, M. *Ciência e Cultura* **1993**, *45*, 27–36.
21. Schmid, F.; Stone, B. A.; McDougall, B. M.; Bacic, A.; Martin, K. L.; Brownlee, R. T. C.; Chai, E.; Seviour, R. J. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 163–171.
22. Scweiger-Hufnagel, U.; Ono, T.; Izumi, K.; Hufnagel, P.; Morita, N.; Kaga, H.; Morita, M.; Hoshino, T.; Yumoto, I.; Matsumoto, N.; Yohida, M.; Sawada, M. T.; Okuyama, H. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 183–187.
23. Masaki, A.; Kawaguchi, K.; Miyaji, H.; Nagae, H.; Hokkoku, S.; Kakuta, M.; Sasaki, T. *Carbohydr. Res.* **1984**, *129*, 209–227.
24. Vogel, H. J. *Genetic Bull.* **1956**, *13*, 42–43.
25. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
26. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
27. Fan, J.-Q.; Namiki, Y.; Matsuoka, K.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 375–378.
28. Weitzhandler, M.; Kadlecek, D.; Avdalovic, N.; Forbes, J. G.; Chow, D.; Townsend, R. R. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5121–5130.
29. Elifio, S. L.; Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J. *New Phytol.* **2000**, *148*, 327–334.
30. Pazur, J. H. In *Neutral polysaccharides*; Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F., Eds. Carbohydrate analysis: a practical approach; 2nd ed; IRL Press: Oxford, 1994; pp 73–124.
31. Bouveng, H. O.; Lindberg, B. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 296–298.
32. Corradi da Silva, M. L.; Iacomini, M.; Jablonski, E.; Gorin, P. A. J. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 547–552.
33. Woranovicz, S. M.; Pinto, B. M.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 395–402.
34. Fabre, I.; Bruneteau, M.; Ricci, P.; Michel, G. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 99–103.
35. Ukai, S.; Yokoyama, S.; Hara, C.; Kiho, T. *Carbohydr. Res.* **1982**, *105*, 237–245.
36. Lee, Y. C.; Rice, K. G. In *Fractionation of glycopeptides and oligosaccharides from glycoproteins by HPLC*; Fukuda, M.; Kobata, A., Eds. Glycobiology: a practical approach; IRL Press: Oxford, 1993; pp 127–164.
37. Rice, K. G.; Corradi da Silva, M. L. *J. Chromatogr., A* **1996**, *720*, 235–249.
38. Gorin, P. A. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1981**, *38*, 12–104.