



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE LONDRINA**

CASSIANO CORREA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA POR
Botryosphaeria rhodina NA PRESENÇA DE ÓLEO DE SOJA E
TWEEN 80**

Londrina
2007

CASSIANO CORREA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA POR
BOTRYOSPHERA RHODINA NA PRESENÇA DE ÓLEO DE
SOJA E TWEEN 80**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Aneli de Melo Barbosa

Co-orientador: Prof. Dr. Robert F. H. Dekker

Londrina
2007

CASSIANO CORREA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA POR
BOTRYOSPHERA RHODINA NA PRESENÇA DE ÓLEO DE
SOJA E TWEEN 80**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Aneli de Melo Barbosa

Prof^ª Dr^ª Maria de Lourdes Corradi da Silva

Prof. Dr. Rui Sérgio S. F. Silva

Londrina, 22 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Nancy e Vicente por TODO o apoio;

À Prof^a Aneli Barbosa e ao Prof. Robert Dekker pela valiosa oportunidade de me orientarem neste trabalho;

À CAPES pela bolsa de mestrado;

À Prof^a Dr^a Maria Inês Rezende pelas sugestões na composição do trabalho escrito;

Ao técnico Nelson J. Rodriguez pela ajuda no desenvolvimento das técnicas de laboratório;

Aos professores e funcionários do Depto. de Bioquímica e Biotecnologia da UEL que contribuíram com este trabalho;

Ao Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da UEL, pela permissão de utilização do software Statistica versão 5.1;

Ao Prof. Dr. Rui Sérgio S. F. Silva do DCTA/UEL, pela assessoria com a metodologia estatística;

À Prof^a Dr^a Ieda S. Scarmínio do Depto. de Química da UEL pelas sugestões e esclarecimentos pertinentes à metodologia estatística;

À equipe do Laboratório de Química de Carboidratos da FCT/UNESP (Pres. Prudente): Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Corradi da Silva e técnica de laboratório Marilsa S. Cardoso;

Aos meus colegas e amigos Robson Machado, Michelle Batista, Eliane Kaori Fukuda e Josana Messias pelas histórias que levaremos;

“Tudo passa sobre a terra.”

José de Alencar

SILVA, Cassiano Correa. **Otimização da produção de botriosferana por *Botryosphaeria rhodina* na presença de óleo de soja e tween 80.** 2007. 109f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados o efeito da adição de óleo de soja, óleo de babaçu, etanol e Tween 80 na produção de botriosferana, um exopolissacarídeo (EPS) do tipo β -(1,3)(1,6)-D-glucana, secretado no meio de cultivo pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. Também foi otimizada a produção desta β -glucana utilizando a abordagem fatorial, após triagem prévia das variáveis que mais influenciaram na sua produção. A adição de óleo vegetal aumentou a produção do EPS, enquanto que a de etanol não promoveu diferença significativa na produção. O tempo e o pH inicial de cultivo, as concentrações de glucose, óleo de soja e de Tween 80 foram as variáveis que demonstraram efeito significativo na produção de botriosferana. A condição otimizada para a produção do EPS foi glucose 40 g/L, óleo de soja 10 mL/L, Tween 80 4,5 g/L, durante 72 horas a 180 rpm, 28 °C, pH inicial 5,7 com 7 mL de inóculo para cada 100 mL de meio de cultivo, na condição estabelecida. A produção de botriosferana prevista pelo modelo matemático foi $8,22 \pm 1,36$ g/L, enquanto que a produção obtida na validação experimental foi $7,74 \pm 0,13$ g/L, confirmando o resultado previsto. A caracterização parcial de botriosferana produzida na condição otimizada mostrou que o óleo de soja e Tween 80 não afetaram as características estruturais da molécula do EPS.

Palavras-chave: Botriosferana. *Botryosphaeria rhodina*. Exopolissacarídeo. Óleo de soja. Tween 80. Metodologia de superfície de resposta.

SILVA, Cassiano Correa. **Optimisation of production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina* in the presence of soya bean oil and Tween 80.** 2007. 109f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina. 2007.

ABSTRACT

The effects of the addition of soya bean oil, babassu oil, ethanol and Tween 80 on the production of botryosphaeran, a β -(1,3)(1,6)-D-glucan exopolysaccharide (EPS) secreted by the ascomycetous fungus *Botryosphaeria rhodina*, were evaluated in this work. Production of this β -glucan was also optimised using the factorial approach, following initial screening for variables that most markedly influenced botryosphaeran production. The addition of vegetable oil enhanced EPS production, whereas ethanol had no significant effect on production of this β -glucan. The variables initial pH and growth time, as well as glucose, soya bean oil and Tween 80 concentrations showed significant effect on botryosphaeran production. Optimised conditions for production of this EPS was 40 g/L glucose, 10 mL/L soya bean oil, 4,5 g/L Tween 80, during 72 hours and 180 rpm shaking rate, at 28 °C, initial pH 5,7 and 7 mL of inoculum for each 100 mL of culture media, under standard conditions previously established. Botryosphaeran production predicted by the fitted model was 8.22 ± 1.36 g/L, whereas production observed in experimental validation was 7.74 ± 0.13 g/L, which is in agreement with predicted values. Partial characterisation of botryosphaeran produced under optimal conditions showed that the use of soya bean oil and Tween 80 did not affect structural features of the molecule.

Keywords: Botryosphaeran. *Botryosphaeria rhodina*. Exopolysaccharide. Soya bean oil. Tween 80. Response surface methodology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química dos Tweens	19
Figura 2 –	Protocolos de extração de botriosferana do meio de cultivo submerso de <i>B. rhodina</i> ; A) Protocolo I; B) Protocolo II	38
Figura 3 –	Efeito do tempo de cultivo na produção de botriosferana na ausência e na presença de 10 mL/L de óleo de soja.....	46
Figura 4 –	Produção de botriosferana na presença de etanol e diferentes óleos	50
Figura 5 –	Perfil de produção do EPS botriosferana e de biomassa fúngica na ausência e na presença de Tween 80, com ou sem óleo de soja	52
Figura 6 –	Valores previstos versus valores observados para o modelo ajustado. R^2 ajustado = 0,89; QM Resíduo = 0,53	68
Figura 7 –	Superfície ajustada para a variável dependente EPS (g/L). Glucose (x_1) = 40 g/L; R^2 ajustado = 0,89; QM Resíduo = 0,53. A) Curva de Nível B) Diagrama tridimensional.....	69
Figura 8 –	Perfil de eluição da botriosferana produzida na condição otimizada na presença de óleo de soja e Tween 80, em Sepharose CL 4B utilizando água destilada como fase móvel	71
Figura 9 –	Espectro FTIR da botriosferana produzida na condição otimizada.....	72
Figura 10 –	Análise por HPAEC dos produtos de hidrólise da botriosferana produzida na condição otimizada	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento fatorial 2^4 em dois blocos para avaliar os efeitos das variáveis independentes tempo de cultivo, volume de inóculo padrão, concentração de glucose e concentração de Tween 80.....	40
Tabela 2 – Delineamento fatorial 2^4 em dois blocos para avaliar os efeitos das variáveis independentes pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e concentração de Tween 80.....	41
Tabela 3 – Delineamento Box-Behnken para 3 variáveis em 3 níveis.....	42
Tabela 4 – Produção de botriosferana por <i>B. rhodina</i> em 10 mL/L de óleos de diferentes procedências, em 144 horas de tempo de cultivo.....	48
Tabela 5 – Produção de botriosferana em óleo de soja (10 mL/L), babaçu 10 mL/L) e etanol (20 mL/L), em 144 horas de cultivo	49
Tabela 6 – Produção de botriosferana e de biomassa fúngica na presença de óleo e tensoativo, em 144 horas	51
Tabela 7 – Produção de botriosferana e de biomassa fúngica em diferentes valores de pH inicial, na presença de 10 mL/L de óleo de soja.....	54
Tabela 8 – Comparação da produção de botriosferana e biomassa fúngica, determinadas após execução dos protocolos de extração I e II	56
Tabela 9 – Respostas observadas no delineamento fatorial 2^4 em dois blocos, para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo, volume de inóculo padrão, concentração de glucose e concentração de Tween 80.....	58
Tabela 10 – Análise de variância da resposta EPS (g/L); R^2 ajustado = 0,8992.....	59
Tabela 11 – Análise de variância dos valores transformados EPS*; R^2 ajustado = 0,9188.....	60
Tabela 12 – Respostas otidas no delineamento fatorial 2^4 em dois blocos, que avaliou os efeitos das variáveis pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e concentração de Tween 80, no tempo de cultivo de 72 horas, utilizando 4 mL de inóculo padrão/100 mL de meio	63
Tabela 13 – Análise de variância da resposta EPS g/L; R^2 ajustado = 0,95	64

Tabela 14 – Resultados do delineamento Box-Behnken para 3 variáveis em 3 níveis, em tempo de cultivo 72 horas, utilizando 7 mL de inóculo padrão/100 mL de meio de cultivo e pH inicial 5,7.....	67
Tabela 15 – Análise de variância da resposta EPS (g/L); R^2 ajustado = 0,89	68

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA	–	Análise de variância
ATP	–	Adenosina trifosfato
BDA	–	Ágar-batata dextrosado
DP	–	Desvio-padrão
EPS	–	Exopolissacarídeo
FTIR	–	Espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier
g	–	Grama
gl	–	Graus de liberdade
Glc	–	Glucose
GTP	–	Guanosina trifosfato
HPAEC	–	Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência
kDa	–	Quilodáton
L	–	Litro
mL	–	Mililitro
MSR	–	Metodologia de Superfície de Resposta
QM	–	Quadrado médio
R²	–	Coefficiente de determinação
rpm	–	Rotação por minuto
SQ	–	Soma dos quadrados
TBHQ	–	<i>terc</i> -butil hidroxiquinona
TFA	–	Ácido trifluoroacético
UDP	–	Uridina difosfato
VGA	–	Vogel-glucose-ágar
vvm	–	Volume de ar/volume de meio/minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 COMPOSTOS LIPOFÍLICOS	17
3.1.1 Lipídios.....	17
3.1.1.1 Acilgliceróis (glicerídeos)	17
3.1.1.2 Foffolipídeos.....	18
3.1.1.3 Dolicol	18
3.1.2 Tensoativos – Tween ®	19
3.2 EXOPOLISACARÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES.....	20
3.3 BETA-GLUCANAS.....	23
3.3.1 Bio ssintese de β -Glucanas	26
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE EPS FÚNGICOS	26
3.5 ÒLEOS VEGERTAIS E ÁCIDOS GRAXOS COMO FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE EPS.....	28
3.6 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS E A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR): UM RECURSOS PARA OTIMIZAR A PROCUÇÃO DE BOTRIOSFERANA	29
3.7 BOTRYYOSPHAERIA RHODINA E SYA BD-GLUCANA BOATRIOSFERANA.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 REAGENTES	33
4.2 EQUIPAMENTOS	34
4.3 MANUTENÇÃO DE BOTRYOSPHAERIA RHODINA.....	34
4.4 CONDIÇÕES DE CULTINO DE B. RHODINA.....	34
4.4.1 Pré-Inóculo	34
4.4.2 Inóculo	35

4.4.3 Preparo dos meios e cultivo do Microorganismo	35
4.5 PARÂMETROS AVALIADOS NA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA.....	36
4.5.1 Efeito do Tempo de Cultivo	36
4.5.2 Influência do Fornecedor de Óleo de Soja na Produção de Botriosferana.....	36
4.5.3 Produção de Botriosferana na Presença de óleo de Soja Conservado com TBHQ.....	36
4.5.4 Efeito do Tensoativo Tween [®] -80 na Produção de Botriosferana.....	37
4.5.5 Efeito do pH inicial na produção de botriosferana.....	37
4.6 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE BOTRIOSFERANA DO MEIO DE CULTIVO.....	37
4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA ATRAVÉS DE EXPERIMENTOS FATORIAIS E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR).....	39
4.7.1 Primeira Triagem de Variáveis.....	39
4.7.2 Segunda Triagem de Variáveis.....	40
4.7.3 Otimização da Produção de Botriosferana por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	42
4.8 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BOTRIOSFERANA PRODUZIDA NA CONDIÇÃO ÓTIMA	43
4.8.1 Cromatografia de Filtro em Gel	43
4.8.2 Hidrólise ácida total e cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC)	44
4.8.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR).....	44
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4.10 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	45
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	46
5.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA	46
5.1.1 Efeito da Adição de Óleo e do Tempo de Cultivo na Produção de Botriosferana.....	46
5.1.2 Influência do Fornecedor de Óleo de Soja na Produção de Botriosferana.....	47

5.1.3 Produção de Botriosferana na Presença de Óleo de Soja conservado com TBHQ Óleo de Babaçu e Etanol	49
5.1.4 Efeito do Tensoativo Tween 80 na Produção de Botriosferana	51
5.1.5 Efeito do pH Inicial na Produção de Botriosferana na Presença de 10 mL/L de Óleo de soja durante 144 horas de Cultivo	53
5.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE BOTRIOSFERANA DO MEIO DE CULTIVO	55
5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA ATRAVÉS DE EXPERIMENTOS Fatoriais e Análise por Metodologia de superfície de Resposta (MSR)	57
5.3.1. Primeira Triagem de Variáveis.....	57
5.3.2 Segunda Triagem de Variáveis.....	62
5.3.3 Otimização da Produção de Botriosferana por Metodologia de superfície de Resposta (MSR)	66
5.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BOTRIOSFERANA APRODUZIDA NA CONDIÇÃO OTIMIZADA NA PRESENÇA DE ÓLEO DE SOJA E TWEEN 80	70
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	81
APÊNDICE A – Artigo científico: “Effects of soybean oil and Tween 80 on production of botryosphaeran by Botryosphaeria rhodina”	82
ANEXOS	101
ANEXO A – Composição Nominal do óleo de soja Liza	102
ANEXO B - Guia Para Autores Do Periódico Process Biochemistry.....	104

1 INTRODUÇÃO

Compostos lipofílicos são aqueles que possuem em sua estrutura química uma porção apolar, que promove interação com outras moléculas apolares, como as cadeias de acil graxo dos fosfolipídeos das membranas biológicas. Exemplos de compostos com essas características de polaridade, potencialmente capazes de interagir com membranas biológicas, são os triacilgliceróis, os quais são ésteres de ácidos graxos e glicerol, e os tensoativos como os da marca Tween[®], que são ésteres de ácidos graxos e polioxietileno sorbitano.

Esses ésteres de acila, sob a ação de lipases (acil hidrolases), podem ser convertidos em seus produtos de hidrólise, que são o glicerol (no caso dos triacilgliceróis) ou o núcleo polioxietileno sorbitano (no caso dos Tweens), além dos ácidos graxos livres. Estes produtos podem ser incorporados à membrana temporariamente, alterando suas características, e são posteriormente degradados na β -oxidação de ácidos graxos. Sabe-se que o comprimento da cadeia e a presença de insaturações determinam a extensão desses efeitos (PARK et al., 2002a; YANG et al., 2000; ANGELOVA e SCHMAUDER, 1999). A hidrólise dos Tweens 20, 40, 60 e 80 produz, além do polioxietileno sorbitano livre, os ácidos láurico (C12), palmítico (C16), esteárico (C18) e oléico (C18:1), respectivamente.

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias que são secretados no meio de cultivo ou permanecem ligados à superfície das células (SUTHERLAND, 1998). Um exemplo de EPS é o botriosferana, um novo polissacarídeo produzido pelo ascomiceto do gênero *Botryosphaeria* descrito por Barbosa e colaboradores (2003). Este biopolímero é constituído por resíduos de moléculas de glucose unidos por ligações glicosídicas tipo β -(1,3) na cadeia principal, apresenta aproximadamente 22 % de ramificações, constituídas por resíduos de glucosil e gentiobiosil vinculados à cadeia principal por ligações tipo β -(1,6) (BARBOSA et al., 2003).

Além da glucose, a β -glucana botriosferana pode ser produzida em outras diferentes fontes de carbono tais como frutose, manose, sacarose, melão de cana de açúcar (STELUTI et al., 2004). O grau de ramificação deste EPS pode ser alterado dependendo da fonte de carbono utilizada. Quando frutose foi utilizada como fonte de carbono, cerca de 31 % de ramificação foi detectada, enquanto que em sacarose, o grau de ramificação foi 21 %, ou seja, mais próximo do valor obtido em glucose (CORRADI DA SILVA et al., 2005).

As aplicações dos EPS são bastante variadas, e na indústria de alimentos podem ser utilizados como espessantes, geleificantes, emulsificantes, entre outras aplicações. Também possuem propriedades nutracêuticas que viabilizam seu uso como alimento funcional, e são conhecidos por suas atividades modificadoras de respostas biológicas, especialmente como agentes imunomoduladores e anti-tumorais. Adicionalmente, resultados dos testes de genotoxicidade desses exopolissacarídeos determinarão seu emprego em produtos para a saúde humana e animal (SUTHERLAND, 1998).

Embora ainda não haja estudos sobre o uso da botriosferana como matéria-prima em formulações farmacêuticas e cosméticas, já é conhecida a participação de outros exopolissacarídeos microbianos tais como xantana, gelana, curdlana, levana em alimentos (SUTHERLAND, 2001). Recentemente também foi descrito o uso de escleroglucana, uma β -(1,3; 1,6)-D-glucana produzida por fungos do gênero *Sclerotium*, em dispositivos de liberação modificada de fármacos, o que amplia as perspectivas de exploração das propriedades tecnológicas de β -glucanas na indústria farmacêutica (COVIELLO et al., 2005). O amplo uso desses polímeros nas indústrias farmacêutica e cosmética está vinculado às suas respectivas características estruturais, responsáveis por suas propriedades reológicas, o que certamente direcionará o seu emprego em escala industrial.

A otimização do processo fermentativo de produção dos EPS é de grande importância para a sua produção em escala industrial. Nos estudos desenvolvidos até o presente, sobre a produção da botriosferana por via submersa, ainda em experimentos de cultivo em frascos em escala laboratorial, foi verificado que sacarose e glucose, na concentração de 50 g/L, foram as melhores fontes de carbono (STELUTTI et al., 2004). A melhor fonte de nitrogênio foi o nitrato de amônio (NH_4NO_3) (COVIZZI et al., 2005), e o tamanho do inóculo foi padronizado em 4 mL de suspensão de micélio/100 mL de meio de cultivo (BARBOSA et al., 2003). Entretanto, é conhecido na literatura de produção de EPS que compostos lipofílicos, quando adicionados ao meio de cultivo, podem proporcionar um aumento da produção de EPS (STASINOPOULOS e SEVIOUR, 1990; YANG, 2000; PARK, 2002a).

Portanto, considerando-se que ainda não foi descrito na literatura científica qualquer estudo referente à influência de compostos lipofílicos (óleos vegetais, tensoativos, ácidos graxos, etc.) na produção de botriosferana por *Botryosphaeria rhodina*, neste trabalho foi avaliada a influência de óleo de babaçu e óleo de soja, na presença e ausência de Tween 80, na produção de botriosferana em cultivo submerso, conforme os objetivos delineados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

-Otimizar a produção de botriosferana através de planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta (MSR), analisando as variáveis: concentração de óleo de soja, concentração de Tween 80 e concentração de glucose;

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da adição de óleo de soja e do tensoativo Tween 80 ao meio de cultivo na produção de botriosferana;
- Padronizar um protocolo de extração de botriosferana do meio de cultivo contendo óleo;
- Avaliar os efeitos das variáveis: tempo de cultivo, pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e de Tween 80 na produção de botriosferana, através de planejamento fatorial;
- Otimizar a produção de botriosferana utilizando-se as variáveis significativas selecionadas em 2.2.3, através de metodologia de superfície de resposta.
- Caracterizar parcialmente a botriosferana produzida na condição otimizada quanto à homogeneidade, tipo de ligações β -glicosídicas e composição em monossacarídeos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS LIPOFÍLICOS

3.1.1 Lipídeos

3.1.1.1 Acilgliceróis (glicerídeos)

Acilgliceróis são ésteres de glicerol (1,2,3-propanotriol) e ácidos graxos. Podem ocorrer em diferentes graus de esterificação, podendo ser denominados mono-, di- ou triacilgliceróis, quando se encontram esterificados com uma, duas ou três moléculas de ácido graxo, respectivamente. Glicerídeos parciais são importantes intermediários do metabolismo, e os triacilgliceróis são os principais componentes de gorduras e óleos vegetais (GUNSTONE et al., 1994).

A composição das cadeias acil esterificadas com o glicerol varia em diferentes lipídeos vegetais. Manteiga de cacau, óleo de palma do Congo e de Sumatra e óleo de oliva são ricos em ácidos palmítico (C16), esteárico (C18) e oleico (C18:1), nas composições C16-C18:1-C18, C16-C18:1-C16, C16-C18:1-C16 e C18:1-C18:1-C18:1, respectivamente. Outros óleos vegetais são ricos em ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), e entre eles destacam-se os óleos de milho, algodão, amendoim, linhaça, gergelim, soja e girassol, cujos principais glicerídeos componentes são os seguintes, respectivamente: C18:2-C18:2-C18:1, C18:2-C18:2-C18, C18:2-C18:1-C18, C18:3-C18:3-C18:3, C18:2-C18:1-C18:1, C18:2-C18:2-C18:1 e C18:2-C18:2-C18:1. O óleo de babaçu, uma palmácea nativa das Américas Central e do Sul, é rico em ácido láurico (C12), apresentando também os ácidos mirístico (C14) e oleico (GUNSTONE et al., 1994).

3.1.1.2 Fosfolipídeos

Fosfolipídeos são lipídeos que apresentam um grupo fosfato na sua estrutura, e podem ser classificados em dois principais grupos: glicerofosfolipídeos (ou fosfoglicerídeos), que são baseados em um núcleo glicerol, e esfingofosfolipídeos, que contêm esfingosina ou outro aminoálcool semelhante (GUNSTONE et al., 1994).

A estrutura geral de um fosfoglicerídeo constitui-se de uma molécula de glicerol esterificada, dois radicais acil e um fosfato, que por sua vez, também apresenta substituintes: o aminoácido L-serina (fosfatidilserina), aminas (fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, a última abundante em plantas), o açúcar inositol (fosfatidilinositol, presente na maioria dos eucariotos, incluindo plantas, animais e leveduras), entre outros (GUNSTONE et al., 1994).

3.1.1.3 Dolicol

A biossíntese de polissacarídeos a partir de intermediários nucleotídeo-açúcar requer a ativação química do monômero de açúcar através de sua ligação a um dolicol, um carreador lipídico de unidades sacarídicas. Essa molécula é sintetizada a partir de isopentenil pirofosfato na mesma via de síntese do colesterol, e é constituída por uma longa cadeia poliisoprenóide à qual se liga um grupamento álcool primário terminal. A quantidade de unidades isoprenóides é característica das diferentes espécies, podendo variar de 17 a 21 unidades de isopreno nos dolicíis de animais, 11 nos das bactérias e 14 a 21 nos das plantas e fungos. Os dolicíis são sintetizados nos organismos a partir do isopentenil pirofosfato, um precursor ativado de um grande número de biomoléculas lipídicas como as vitaminas lipossolúveis, carotenóides, esteróides, entre outros. São altamente apolares e mantêm fortes interações com os lipídeos das membranas, o que permite ancorar açúcares às membranas durante as reações de biossíntese de polissacarídeos (NELSON e COX, 2004).

3.1.2 Tensoativos - Tween®

São tensoativos não iônicos, produzidos sinteticamente a partir de óxidos de alquilenos e ácidos graxos. A característica hidrofílica é proporcionada pelos grupos hidroxila e oxietileno livres, enquanto a porção lipofílica é encontrada nas longas cadeias de ácidos graxos utilizadas. Tween 80 é um componente oficial de formulações farmacêuticas, conhecido também como polissorbato 80. Quimicamente é definido como o éster oleico de sorbitano copolimerizado com aproximadamente 20 mols de oxietileno (Figura 1). Há também outros Tweens, que se diferenciam entre si pelo tamanho da cadeia do ácido graxo esterificado, sendo os Tween 20, 40 e 60 respectivamente ésteres dos ácidos láurico (C12), palmítico (C16) e esteárico (C18) (BUDAVARI et al., 2001).

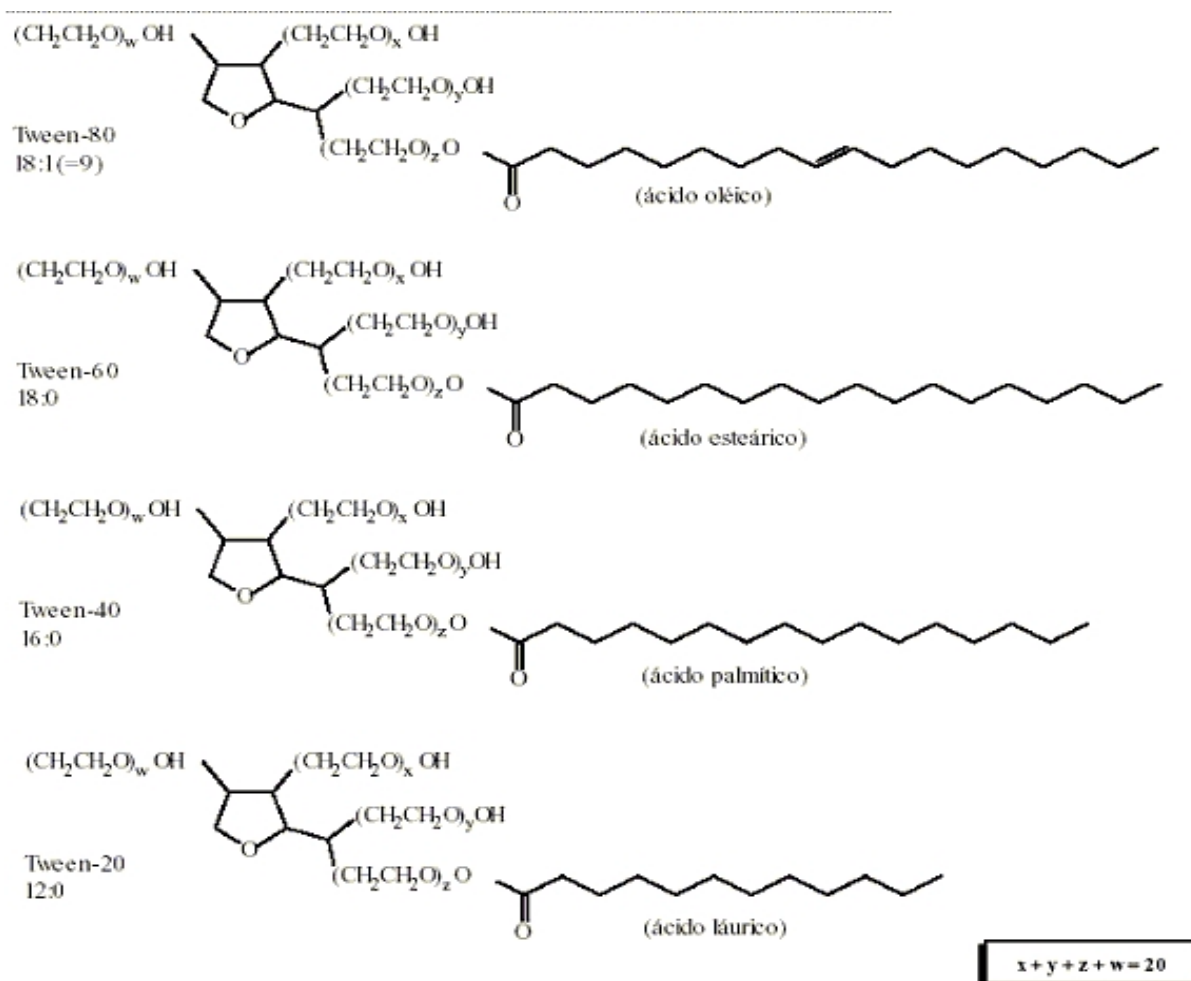


Figura 1 – Estrutura química dos Tweens (Giese et al., 2004).

3.2 EXOPOLISACARÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES

Polissacarídeos são macromoléculas naturais, encontradas em todos os seres vivos, sendo o grupo de compostos mais abundantes na biosfera (BARBOSA et al., 2004). Muitos polissacarídeos e também carboidratos complexos tipo proteína-polissacarídeos já foram isolados de fungos, algas, líquens e plantas (EL-DEIN et al., 2004).

Os polissacarídeos sintetizados por microrganismos podem permanecer ligados à superfície celular, ou serem liberados no meio de cultivo, na forma de material viscoso sem forma própria. Nos ambientes que esses microrganismos colonizam, esses polímeros podem estar relacionados com a sua virulência, como é o caso dos patógenos de animais e vegetais, bem como com interações microrganismo-planta, ou mesmo a proteção contra dessecação ou ataque por macrófagos e protozoários.

De forma geral, os polissacarídeos são componentes fundamentais para a formação de biofilmes, que atuam como suporte físico para a colonização microbiana, no qual microrganismos procarióticos e eucarióticos podem crescer fixados à interface sólido-líquido (SUTHERLAND, 1998).

Além de oferecer sustentação física para o crescimento microbiano, a matriz polissacarídica sintetizada pelo microrganismo também oferece características diferenciadas de permeabilidade, dada a solubilidade do polissacarídeo, presença de cargas, conformação da rede, entre outros fatores. Essas características de permeabilidade diferenciada do meio são de interesse na farmacoterapia antimicrobiana, na medida em que pode haver diminuição da disponibilidade de agentes anti-fúngicos administrados ao paciente, como é o caso de infecções pelo fungo leveduriforme *Candida albicans* (MUKHERJEE e CHANDRA, 2004).

Por outro lado, essas propriedades naturais de difusão diferenciada proporcionadas pelos constituintes das matrizes polissacarídicas sintetizadas por microrganismos podem ser exploradas segundo perspectivas tecnológicas positivas. Polissacarídeos com essas propriedades têm potencial aplicabilidade em sistemas farmacêuticos de liberação modificada baseados em polímeros, que permitem o controle da velocidade e do sítio de liberação do fármaco (JAGUR-GRODZINSKI, 1999).

Vários polissacarídeos são amplamente aceitos como produtos biotecnológicos, enquanto outros ainda estão em diferentes estágios de desenvolvimento. Alguns são empregados devido às suas propriedades físicas únicas ou superiores, comparadas às dos polissacarídeos obtidos de plantas. Esse é o caso da xantana, uma glicana produzida

por *Xanthomonas campestris*, e da gelana (Gelrite®) de *Sphingomonas paucimobilis* (SUTHERLAND, 1998).

A celulose bacteriana, uma β -(1,4)-glucana, é um interessante produto industrial, apesar da ampla disponibilidade de celulose de plantas. Esse exopolissacarídeo é produzido e secretado por *Acetobacter xylinum*, apresenta-se na forma de microfibrilas que se agregam na superfície do meio de cultivo como uma película. É usado em uma preparação industrial denominada “BioFill”, que é utilizada como material de revestimento para proteção de feridas em pacientes com queimaduras, úlceras dérmicas crônicas e outros processos de perda extensiva de pele (SUTHERLAND, 1998).

Outros EPS também têm importantes aplicações, como é o caso das escleroglucanas, um grupo de α -(1,3)-D-glucanas estruturalmente relacionadas, produzidas por várias espécies de fungos, incluindo *Sclerotium rolfsii* e o basidiomiceto *Schizophyllum commune*. A cadeia principal é constituída de resíduos glucosil unidos por ligações α -(1,3)-glicosídicas, aos quais se ligam resíduos α -(1,6)-D-glucosil aleatoriamente ou com frequência variável. O grau de ramificação da estrutura é amplamente variável, e isso afeta a sua solubilidade. As estruturas mais solúveis produzem soluções altamente viscosas nas quais o polissacarídeo adota uma conformação em tripla hélice (SUTHERLAND, 1998).

Recentemente também foi relatado o uso de escleroglucana em dispositivos de liberação modificada de fármacos. Devido às suas propriedades reológicas e sua resistência à hidrólise, temperatura e eletrólitos, a escleroglucana apresenta diversas aplicações industriais, incluindo recuperação de óleo, produção de adesivos, tintas, e rações animais líquidas. Na indústria cosmética, a escleroglucana é usada em várias preparações para o cuidado da pele, como géis, cremes, entre outras. Em produtos farmacêuticos, é usada com laxativo, estabilizante de emulsões e revestimento de comprimidos. Na indústria de alimentos também pode ser utilizada no melhoramento da qualidade de alimentos congelados, produtos de confeitaria, entre outras aplicações (COVIELLO et al., 2005).

Outra aplicação das α -(1,3)-D-glucanas é devida às suas propriedades como agentes anti-infecciosos, podendo ser utilizadas em infecções virais e bacterianas, bem como agentes anti-tumorais. Essas glucanas atuam em várias respostas de defesa do hospedeiro, através de mecanismos ainda não totalmente elucidados (SUTHERLAND, 1998).

3.3 BETA-GLUCANAS

Conforme exposto anteriormente, polissacarídeos são polímeros de açúcares encontrados em uma vasta gama de organismos vivos. As β -glucanas são uma classe de polissacarídeos constituídos por unidades repetitivas (monômeros) de glucose, unidas por ligações do tipo β , e representam a maioria dos exopolissacarídeos sintetizados por fungos (BARBOSA et al., 2004).

Diversos microrganismos são conhecidos por serem produtores de β -glucanas, destacando-se os do gênero *Sclerotium*, que produzem escleroglucana, uma β -(1,3)-glucana bastante estudada (FARIÑA et al., 2001; SURVASE et al., 2006). Outras espécies produtoras de β -glucanas incluem *Claviceps fusiformis*, *Monilia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Acremonium diospyri*, *A. persicinum*, *Epicoccum purpurascens*, *Phanerochaete chrysosporium* (SEVIOUR et al., 1992), e mais recentemente *Botryosphaeria rhodina* (SELBMANN et al., 2002; BARBOSA et al., 2003).

Além das aplicações tecnológicas desses exopolissacarídeos, as β -glucanas são bastante conhecidas por suas atividades biológicas modificadoras de respostas do hospedeiro, podendo ser destacadas as atividades antitumoral e imunomoduladora (JAGUR-GRODZINSKI, 1999; WASSER, 2002; ZHANG et al., 2005). Tais atividades estão relacionadas a respostas de defesa do hospedeiro, através de ativação do sistema complemento pelo mecanismo alternativo.

Como exemplos de β -glucanas com atividades conhecidas como modificadoras de respostas biológicas podem ser citadas a escleroglucana e a curdlana, cujos efeitos incluem a estimulação de resposta imune não específica do hospedeiro, e ainda a lentinana, outra β -glucana fúngica com potencial de atividades antitumoral e imunomoduladora.

Os mecanismos de ação desses exopolissacarídeos ainda não são claramente conhecidos, mas acredita-se que essas atividades estejam relacionadas à conformação em tripla-hélice adotada pela glucana, bem como ao peso molecular e à disposição das cadeias laterais (SUTHERLAND, 1998). Considerando ainda as atividades biológicas das β -glucanas, recentemente foi observado que elas podem proteger as células contra danos oxidativos do material genético pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultante da remoção de radicais hidróxido e oxigênio singlete (SLAMENŇOVÁ et al., 2003).

3.3.1 Biossíntese de β -Glucanas

Uma parte significativa do conhecimento sobre a biossíntese de β -glucanas surgiu a partir do interesse em se conhecer os mecanismos de síntese da parede celular de fungos patogênicos, entre eles *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Nesses microrganismos, o polissacarídeo β -(1,3)-D-glucana é um importante componente da parede celular, sintetizado por um complexo enzimático denominado UDP-glucose β -(1,3)-D-glucana β (3)-D-glucosiltransferase, ou β -(1,3)-glucana sintase (DOUGLAS, 2001).

A compreensão dessas vias biossintéticas é importante para a otimização de parâmetros de fermentação e rendimento dos processos empregados na produção industrial de glucanas, e também permite a compreensão das propriedades físico-químicas desses polissacarídeos.

O estudo com frações de membrana plasmática de diferentes ascomicetos filamentosos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, ascomicetos não filamentosos (*Schyzosaccharomyces pombe*), deuteromicetos (*Candida albicans*), basidiomicetos (*Cryptococcus neoformans*), e até mesmo oomicetos (*Phytophthora* spp.), que não são fungos verdadeiros, levou à indentificação de complexos enzimáticos associados à membrana que utilizam unidades glucosil ativadas, na forma do nucleotídeo uridina difosfato-glucose (UDP-glucose), como substrato para produzir um polissacarídeo linear. Essas reações ocorrem de maneira seqüencial e progressiva, sendo 1 mol de glucose adicionado à cadeia, a cada 1 mol de UDP-glucose hidrolisado, o que diferencia a β -(1,3)-glucana sintase de outras glicosiltransferases não progressivas, que adicionam indistintamente mono- ou oligossacarídeos a aceptores como proteínas, lipídeos ou outros açúcares (DOUGLAS, 2001). A atividade do complexo β -(1,3)-glucana sintase envolve também a participação do nucleotídeo trifosfato de guanosina (GTP), bem como uma proteína à qual ele se liga (SELITRENNIKOFF, 1995).

As β -glucanas cuja síntese está melhor descrita na literatura são as que fazem parte da composição da parede celular de leveduras, especialmente do fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*. Enquanto as β -(1,3)-glucanas com grau de polimerização de aproximadamente 1500 (cerca de 243 kDa) compreendem cerca de 25 % do peso seco da parede celular, as β -(1,6)-glucanas, de menor peso molecular (140 resíduos, aproximadamente 23 kDa) correspondem somente a 7 % da parede celular. A importância das

β -(1,6)-glucanas reside no fato de apresentarem um mecanismo biossintético distinto, através da via secretória, sendo transportadas para a membrana plasmática, transferidas para o exterior da célula e, em seguida, incluídas na parede celular. Diferentemente, na biossíntese das β -(1,3)-glucanas, as enzimas são transportadas e incorporadas na membrana plasmática, e o polímero correspondente é sintetizado e inserido na parede celular (SELITRENNIKOFF, 1995).

A biossíntese de β -(1,3)-glucanas da parede celular de fungos envolve alguns passos.

1. Inicialmente, após a síntese e arranjo no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, o complexo β -(1,3)-glucana sintase é inserido na membrana plasmática da extremidade apical da hifa.
2. A seguir, uma proteína de ligação de GTP interage com o complexo, ativando-o.
3. Ocorre a hidrólise de UDP-glucose na face intracelular do complexo enzimático, acompanhada da adição do resíduo glucosil à cadeia crescente da β -(1,3)-glucana.
4. A glucana é sintetizada e direcionada para a face extracitoplásmica da membrana plasmática.
5. Finalmente, as cadeias de β -(1,3)-glucana são incluídas na parede celular (SELITRENNIKOFF, 1995).

Estudos com preparações de membrana de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com detergente, produzindo uma fração solúvel e um sólido particulado, demonstraram que essas duas frações separadamente não apresentavam atividade biossintética de β -(1,3)-glucana. Essa atividade, no entanto foi parcialmente (60 %) recuperada quando essas frações foram misturadas novamente. Esses resultados mostraram que o complexo β -(1,3)-glucana sintase não é um polipeptídeo único, mas é constituído de um componente catalítico associado à membrana plasmática e outro solúvel, com função regulatória sobre a atividade enzimática. Posteriormente, foi identificado que o componente regulatório solúvel é uma proteína que se liga ao GTP, e dessa forma, o nucleotídeo atua na modulação da atividade da enzima, sendo por sua vez, regulado por um dispositivo que envolve a participação de uma outra proteína, ativadora de GTPase (SELITRENNIKOFF, 1995).

Nas β -glucanas extracelulares, que são liberadas ao meio na forma de exopolissacarídeos, a síntese seqüencial do polímero é feita por complexos enzimáticos de maneira semelhante à que ocorre com as β -(1,3)-glucanas da parede celular. As enzimas

envolvidas na biossíntese desses exopolissacarídeos estão classificadas em 4 grupos (PEPPLER e PERLMAN, 1979):

1. Hexoquinases, ou enzimas envolvidas no metabolismo inicial do substrato;
2. UDP-glucose pirofosforilase e UDP-glucose desidrogenase, ou enzimas responsáveis pela síntese e interconversão de açúcares-nucleotídeos;
3. Transferases, que formam o monômero repetitivo ligado ao carreador lipídico;
4. Translocases ou polimerases, ou enzimas que incluem a macromolécula do exopolissacarídeo.

Segundo esse modelo, o primeiro passo na biossíntese de um exopolissacarídeo é a fosforilação da glucose pela hexoquinase, produzindo glucose-6-fosfato (Glc-6-P). A seguir, ocorre a conversão da Glc-6-P em glucose-1-fosfato (Glc-1-P), pela fosfoglucomutase.

No terceiro passo, o intermediário Glc-1-P é convertido em uridina difosfato-glucose (UDP-glucose), catalisado pela uridina difosfato-glucose pirofosforilase (UDP-glucose pirofosforilase). Esta conversão da glucose em um nucleotídeo-açúcar é fundamental para a biossíntese do exopolissacarídeo, por se tratar do principal precursor dessas biomoléculas, atuando como doador de unidades glucosil.

Um passo seguinte é catalisado pelas transferases de glicosila da membrana periplásmica, no qual o glicosídeo ativado é transferido para o dolicol, um lipídeo carreador de unidades glicosídicas, presente na membrana, com a subsequente liberação do UDP. A ligação do glicosídeo ao dolicol é feita no grupamento álcool terminal do carreador, através de uma ponte pirofosfato.

O quarto passo é representado pela polimerização, que ocorre na superfície externa da membrana plasmática, e após o alongamento da cadeia, há a liberação do polímero no meio extracelular através de um mecanismo ainda não totalmente conhecido (PEPPLER e PERLMAN, 1979).

Dados mais atuais reconhecem a organização das enzimas dos grupos III e IV (transferência dos glicosídeos ativados e polimerização, respectivamente) como componentes de complexos associados à membrana que, de uma forma simplificada, utilizam UDP-glucose como substrato e produzem um polissacarídeo linear (DOUGLAS, 2001).

Há ainda outro mecanismo de biossíntese de polissacarídeos que não requer a participação de intermediários glicosídicos ativados. Nesses casos, a macromolécula é montada diretamente a partir de doadores dissacarídicos, por ação de enzimas específicas que

não têm atividade catalítica sobre Glc-1-P, Glc-6-P, ou outros intermediários fosforilados, como frutose-6-fosfato, frutose-1,6-difosfato e adenosina trifosfato (ATP). As polimerases que catalisam essas reações são a dextrana sacarase, que produzem glucana e frutose livre a partir de sacarose, e também a levana sacarase, que produz frutana e glucose livre, a partir de sacarose, assim como a amilomaltase, que produz glucana e glucose livre a partir de maltose (PEPPLER e PERLMAN, 1979).

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

As exigências nutricionais para a produção de β -glucanas microbianas incluem o uso de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, presentes em meios mínimos ou complexos. Entretanto, se faz necessário fornecer uma fonte de carbono capaz de fornecer glucose ao microrganismo, assim como uma fonte de nitrogênio que permita seu crescimento até a fase estacionária, quando então metabólitos secundários, como as β -glucanas, atingem normalmente seu ápice de produção. Também deve ser observado que glucose livre em excesso pode inibir as vias de síntese de β -glucanas, conforme foi observado por Yang e Hwang (1998) em um estudo de produção de β -(1,3)-glucana por *Ganoderma lucidum*.

Um fungo bastante estudado quanto a produção de glucanas tem sido o ascomiceto *Cordyceps militaris*, um entomoparasita encontrado na Ásia oriental. Em estudo de otimização das condições de cultivo desse fungo para a produção de biopolímeros extracelulares, Park e colaboradores (2001) observaram que os melhores resultados utilizando sacarose como fonte de carbono e pó de extrato de maceração de milho como fonte de nitrogênio, e obtiveram rendimentos de produção de exobiopolímero de 0,95 e 1,97 g/L respectivamente, mantendo-se a proporção de carbono/nitrogênio em 20:1. Esse mesmo grupo obteve resultados semelhantes em outros estudos com o mesmo microrganismo, tendo sido obtido melhores rendimentos em EPS, nas mesmas fontes de carbono e nitrogênio (KIM et al., 2003b; KIM e YUN, 2005), ou ainda, polipeptona como fonte de nitrogênio (KIM et al., 2003a).

Outro fungo conhecido como produtor de β -glucanas é o *Ganoderma lucidum*, um basidiomiceto utilizado na medicina tradicional da China, onde é conhecido como *ling zhi*. Em cultivo submerso, Yang e Hwang (1998) observaram melhores

rendimentos na produção de EPS (0,73 g/L), por este microrganismo, utilizando baixas concentrações de glicose como 20 g/L. Quando aumentaram a concentração de glicose para 50 g/L, o rendimento caiu para 0,55 g/L, e os autores atribuíram a inibição da síntese de glucanas ao excesso de glicose. Foi ainda observado, nesse mesmo estudo, que utilizando-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a relação C/N que promoveu o melhor resultado (0,053 g/L) foi a de 80:1 (YANG e HWANG, 1998).

A influência da aeração na morfologia da massa micelial e na produção de EPS também foi estudada por Park e colaboradores (2002b), que estudaram o efeito da variação da taxa de aeração no cultivo de *Cordyceps militaris* na presença de sacarose como fonte de carbono. Esses autores observaram que o aumento da taxa de aeração de 0,5 para 4 vvm (volume de ar/volume de meio/minuto) promoveu aumento substancial no crescimento micelial no oitavo dia de cultivo (de 9 para 17 g/L), no entanto o melhor rendimento em EPS (14,5 g/L) foi observado utilizando-se a taxa de aeração de 2 vvm. Também foi constatado nesse estudo, que nos valores extremos de taxa de aeração (0,5 e 4 vvm), houve predominância de micélio livre, ao contrário da taxa de aeração intermediária de 2 vvm, na qual predominaram os aglomerados de micélio (*pellets*), associados a uma maior produção do exopolissacarídeo.

Tang e Zhong (2003) avaliaram os efeitos do fornecimento de oxigênio na produção de polissacarídeos intra e extracelulares e de ácido ganodérico por *Ganoderma ludicum*, empregando dois valores de saturação de ar: 10 % e 25 %. Esses autores demonstraram que a saturação de ar em 10 % favoreceu a produção de polissacarídeo extracelular (0,7 g/L), e com o aumento da saturação de ar para 25 % ocorreu maior produção de polissacarídeo intracelular (1,6 g/L) e ácido ganodérico (350 mg/L).

Além desses dois gêneros mencionados, outros fungos produtores de glucanas também foram estudados quanto às condições de cultivo para a produção desses EPS. Xu e Yun (2004) relataram que o ascomiceto *Paecilomyces tenuipes* C240, um parasita de larvas e pupas de traça, produziu EPS (2,36 g/L) na condição de alta aeração de 3,5 vvm.

Bae e colaboradores (2000), estudando a otimização das condições de cultivo para a produção de EPS por *Paecilomyces japonica* em fermentador, observaram maior produção do polissacarídeo (8 g/L) em pH 5,0 e temperatura de 25 °C. Em outro estudo, os mesmos autores ainda observaram, após 10 dias de cultivo, que *P. japonica* produz EPS com maior rendimento (até 30 g/L) quando cultivado em maltose (BAE et al., 2001).

3.5 ÓLEOS VEGETAIS E ÁCIDOS GRAXOS COMO FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

Existem poucos relatos na literatura científica sobre a produção de exopolissacarídeos utilizando óleos vegetais ou ácidos graxos como fonte única de carbono.

Stasinopoulos e Seviour (1990) adicionaram concentrações que variaram de 0 a 5 g/L de óleo de oliva ou óleo de girassol ao meio de cultivo de *Acremonium persicium* para a produção de uma β -glucana, e observaram melhor rendimento (até 28 g/L) na concentração de 5 g/L de óleo de oliva ou 2 g/L de óleo de girassol.

West e Reed-Hamer (1995) estudaram diversos óleos (milho, soja, oliva, amendoim, girassol e cártamo) e observaram que a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 aumentou de 4,97 para 6,63 g/L quando foi adicionado de 2 g/L de óleo de milho ou óleo de soja, utilizando-se sulfato de amônio com fonte de nitrogênio. Já na presença de água de maceração de milho como fonte nitrogênio, somente o óleo de oliva aumentou a produção, de 7,12 para 8,08 g/L.

Youssef e colaboradores (1998) avaliaram o efeito da adição de óleo de oliva e do tensoativo Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano) em cultivos de *Aureobasidium pullulans* na produção de pululana. Observaram um aumento na produção deste exopolissacarídeo de 21 g/L (controle sem óleo e sem tensoativo) para 52 g/L, quando foi adicionado o óleo na concentração de 25 mL/L e tensoativo na concentração de 5 g/L.

Yang e colaboradores (2000) estudaram o efeito da adição de óleos vegetais (soja, amendoim, cártamo, milho, girassol e oliva) na concentração de 1 %, ou ácidos graxos (esteárico, oleico, palmítico e linoleico) em concentrações variando de 0 a 2,5 g/L, em cultivos de *Ganoderma lucidum* para a produção de uma β -(1,3)-D-glucana. Os autores observaram que o óleo de cártamo foi o que promoveu o maior aumento na produção do exopolissacarídeo (de 0,13 para 0,18 g/L), e dentre os ácidos graxos, o ácido palmítico em concentrações próximas de 1,5 g/L foi o melhor, responsável por um aumento de 0,12 para cerca de 0,20 g/L na produção da glucana. Também observaram que o ácido linoleico reprimiu significativamente a produção do exopolissacarídeo (de 0,26 para 0,07 g/L), e totalmente em concentrações iguais ou superiores a 1 g/L desse ácido.

Park e colaboradores (2002a) desenvolveram um estudo sobre a produção de biopolímero extracelular por *Cordyceps militaris*, e avaliaram os efeitos da adição de óleos vegetais (girassol, oliva e amendoim) em concentrações variáveis de 0 a 50 mL/L, e dos

ácidos graxos (palmítico, oleico, esteárico e linoleico) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 %. Esses autores observaram que os óleos de girassol e oliva proporcionaram um aumento significativo da produção de exopolissacarídeo, de 2,5 para cerca de 7 g/L, quando foram adicionados na concentração de 20 mL/L. Os ácidos palmítico e oleico, adicionados na concentração de 0,2 %, promoveram aumento da produção de exopolissacarídeo de 2,3 para cerca de 11 g/L, ao contrário dos ácidos esteárico e linoleico, que tiveram efeito inibitório na produção do biopolímero.

3.6 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS E A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR): UM RECURSO PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA

Um planejamento fatorial de experimentos permite avaliar as contribuições de múltiplos fatores em uma ou mais respostas. Pode-se obter um delineamento fatorial completo com vários fatores em diferentes níveis, totalizando um número de experimentos (*runs*) proporcional à quantidade de fatores e níveis, que permita contemplar todas as combinações possíveis dos níveis selecionados.

O efeito principal de um fator é definido como a mudança na resposta causada pela mudança no nível do fator. Em alguns experimentos, no entanto, a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é a mesma em todos os níveis dos outros fatores, e nesses casos há uma interação entre os fatores.

Os experimentos fatoriais podem ser de dois níveis (2^k), e tais delineamentos são particularmente úteis na etapa exploratória inicial de uma investigação, quando não há muita informação sobre o sistema e o modelo não é conhecido, portanto, os delineamentos 2^k são empregados na triagem de fatores.

Uma representação de modelo de regressão de um experimento fatorial em dois níveis para dois fatores (2^2) está na Equação 1, na qual y é a resposta, β são coeficientes cujos valores devem ser determinados, x_1 é a variável que representa o fator A , x_2 é a variável que representa o fator B , e ε é um termo de erro aleatório.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad \text{Eq. 1}$$

Os níveis das variáveis independentes são comumente representados em escala codificada por +1 e -1, e x_1x_2 é a interação entre os fatores A e B . Como há somente dois níveis para cada variável, um modelo linear pode explicar a correlação entre a resposta e as variáveis independentes ou fatores.

Pode-se ainda adicionar pontos centrais a um delineamento 2^k , o que possibilita a obtenção de uma estimativa independente do erro, especialmente nos casos de delineamentos sem repetição, nos quais não são feitas replicações dos pontos fatoriais.

Devido ao fato de delineamentos para a triagem de fatores incluírem um número potencialmente grande de experimentos, a replicação dos pontos fatoriais nesses casos é frequentemente inviável, e dessa forma, delineamentos sem repetição representam a situação mais comum. Nesses casos, o número de pontos centrais adicionados (n_C) permite a estimativa do erro com $n_C - 1$ graus de liberdade.

Em um delineamento em três níveis para estudar os efeitos de k fatores (3^k), a representação dos níveis das variáveis normalmente é dada por -1, 0 e +1. Um modelo de regressão para um delineamento 3^2 correlacionando a resposta y às variáveis independentes x_1 e x_2 , que representam os fatores A e B respectivamente, é dado na Equação 2. Deve-se observar que a adição de um terceiro nível permite que a relação entre a resposta e os fatores seja feita através de um modelo quadrático (MONTGOMERY, 2005).

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \varepsilon \text{ Eq. 2}$$

Entretanto, um delineamento contendo um número maior de fatores pode atingir um total de experimentos que exceda alguma limitação técnica da metodologia empregada. No exemplo de um delineamento para $k = 6$ fatores, o número de experimentos corresponde a $2^k = 64$, e se por algum motivo esses experimentos não puderem ser conduzidos em um mesmo lote, poderia haver diferenças entre os lotes que afetariam a estimativa dos efeitos. Nesses casos, pode-se optar pela blocagem, que é a divisão dos experimentos em blocos, partindo do princípio que diferenças entre esses blocos promovem uma variação fixa, porém desconhecida na resposta final. Dessa forma, a blocagem pode ser incluída no modelo como um fator, ou removida, se o seu efeito não for significativo (BOX e DRAPER, 1982).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) compreende um grupo de técnicas estatísticas para a modelagem e análise de problemas nos quais as respostas de interesse são influenciadas por diversas variáveis e o objetivo é otimizar essas respostas.

Na maioria das situações em que a MSR é empregada, a relação entre a resposta e as variáveis independentes não é conhecida. Dessa forma, o primeiro passo na MSR é encontrar uma aproximação adequada para a relação funcional real existente entre a resposta (y) e o conjunto de variáveis independentes, normalmente a partir de uma polinomial de ordem inferior em alguma região das variáveis independentes. Se a resposta puder ser explicada por uma função linear, tal aproximação é um modelo de primeira ordem. Se houver curvatura no sistema, um polinômio de grau superior deve ser usado, como o modelo de segunda ordem, contemplando os efeitos quadráticos.

Em suma, os delineamentos fatoriais apresentam importantes vantagens em relação à abordagem clássica de um fator por vez, destacando-se o fato de serem mais eficientes, permitindo a obtenção de uma resposta tão precisa quanto a fornecida por experimentos de um fator, no entanto com um número menor de observações, proporcionando economia de tempo e recursos. Delineamentos fatoriais também são necessários para evitar conclusões equivocadas quando há interações entre as variáveis independentes, e ainda permitem a estimativa de efeitos de um fator em vários níveis de outro fator, produzindo conclusões válidas sobre um amplo espectro de condições experimentais (MONTGOMERY, 2005).

Os recursos de planejamento fatorial e otimização por metodologia de superfície de resposta são aplicáveis em experimentos nas diversas áreas do conhecimento, incluindo estudos de produção de metabólitos de origem microbiana, conforme evidenciado pela expressiva quantidade de trabalhos científicos descrevendo o uso dessa abordagem (DUENAS et al., 2003; MACEDO et al., 2002; RICCIARDI et al., 2002). A otimização da produção de lacase por *B. rhodina* já foi desenvolvida (VASCONCELOS et al., 2000), no entanto ainda não há relatos do uso de planejamento fatorial e MSR no estudo da produção de botriosferana por esse microrganismo.

3.7 BOTRYOSPHAERIA RHODINA E SUA β -D-GLUCANA BOTRIOSFERANA

O *Botryosphaeria rhodina* vem sendo estudado por um dos grupos de Bioquímica Aplicada do Depto de Bioquímica e Biotecnologia da UEL desde 1996. Este microrganismo foi descrito pela primeira vez como ligninolítico e produtor constitutivo de lacases. (BARBOSA et al., 1996). Vasconcelos e colaboradores otimizaram a produção de

lacase na presença de álcool veratrílico (AV), o qual induz significativamente a produção desta polifenoloxidase (VASCONCELOS et al., 2000).

Dekker e Barbosa citaram, pela primeira vez, em 2001, que o *Botryosphaeria rhodina* também secretava no meio de cultivo um exopolissacarídeo (EPS), cujo tratamento com hidrolases comerciais permitiu concluir que se tratava de uma β -glucana.

Posteriormente, Barbosa e colaboradores (2003) isolaram e caracterizaram esta β -glucana após o cultivo do fungo em concentrações elevadas de glucose (50 g/L). Verificaram que este EPS trata-se de uma β -(1,3)-D-glucana, com aproximadamente 22% de ramificações no C-6, constituídas por resíduos de glucosil e gentiobiosil unidos à cadeia principal por ligações glicosídicas tipo β -(1,6). Esse EPS foi então denominado de botriosferana.

Em 2004, Steluti e colaboradores avaliaram diferentes fontes de carbono para a produção de botriosferana pelo *Botryosphaeria rhodina*. A produção do EPS foi avaliada em várias fontes de carbono tais como glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melação de cana de açúcar, e com exceção do manitol, houve produção de botriosferana em todas as fontes avaliadas, as quais foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR) como sendo do tipo β .

Em 2005, Corradi da Silva e colaboradores caracterizaram duas botriosferanas produzidas em sacarose e frutose, respectivamente, como fontes únicas de carbono. Demonstraram que o grau de ramificação da botriosferana produzida em sacarose foi menor (21 %) do que a obtida em frutose (31 %), o que certamente proporcionará diferentes propriedades reológicas aos respectivos polímeros.

Estudos recentes desenvolvidos em camundongos demonstraram que a β -D-glucana botriosferana não é mutagênica (MIRANDA, 2006). Este resultado estimula a pesquisa para o desenvolvimento de novos ensaios biológicos, como também estudos direcionados para a otimização de sua produção conforme descrito previamente nos objetivos deste trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os óleos de soja utilizados foram todos de grau alimentício (Anexo A), das marcas Soya (Bunge Alimentos S/A, em lata de aço conservado com ácido cítrico, ou em frasco de polietileno conservado com TBHQ), Liza (Cargill do Brasil, embalado em frasco de polietileno, conservado com ácido cítrico), ou Cocinero (ADM do Brasil Ltda., embalado em frasco de polietileno, conservado com ácido cítrico e tocoferol).

A cromatografia de filtração em gel foi desenvolvida em gel Sepharose CL 4B (Sigma).

O kit enzimático utilizado na determinação de glucose foi Glucose Bioloquid marca Laborclin.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em balanças semi-analítica Gehaka BG-440 e balança analítica A&D HR-200.

Os meios de cultivo e demais materias foram esterilizados em autoclave vertical Fabbre, modelo 103, a 121 °C por 20 minutos.

As inoculações dos microrganismos e toda a manipulação de material estéril foram conduzidas em câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLFS-09.

Os cultivos em meio sólido foram incubados em estufa incubadora Nova Ética 411D, e os cultivos líquidos foram mantidos em incubadora orbital Cientec CT-712.

As centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada Boeco U-32R. A determinação de pH foi feita em potenciômetro Hanna Instruments HI-9321.

A secagem a peso constante do micélio e EPS precipitado foi conduzida em estufa De Leo.

As determinações fotométricas de glucose residual, açúcares totais e proteínas foram desenvolvidas em espectrofotômetro Shimadzu UV-1240.

A espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR) foi obtida em espectrômetro Bruker modelo Vector 22;

A cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC) foi desenvolvida em equipamento da marca Dionex, utilizando cromatógrafo DX500, coluna Carbopac PA1 acoplada a pré-coluna Aminotrap, detector eletroquímico ED40 e bomba GP40;

4.3 MANUTENÇÃO DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA*

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, isolado do cancro de eucalipto por Barbosa e colaboradores (1995). O fungo foi mantido em meio sólido de ágar-batata dextrosado (BDA) a 4 ± 2 °C com repiques a cada três meses.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *B. RHODINA*

4.4.1 Pré-inóculo

Uma pequena porção de hifas de *B. rhodina* foi transferida do tubo de manutenção (cultivo estoque) para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel, glucose 10 g/L e ágar 20 g/L (VGA). As placas foram incubadas por 5 dias a 28 ± 2 °C. Pequenas porções de hifas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (125 mL), modificados com quatro inserções na parede, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 5 g/L. O pré-inóculo foi mantido sob agitação constante em incubadora orbital durante 48 horas a 28 ± 2 °C e 180 rpm (BARBOSA et al., 2003).

4.4.2 Inóculo

O meio líquido contendo o micélio de 48 horas foi transferido para um *blender* autoclavado, e homogeneizado por 30 segundos à velocidade máxima. O homogenato foi transferido para tubos de centrifuga estéreis de fundo cônico e centrifugado durante 10 minutos a $1790\times g$. O sedimento foi ressuspensionado em solução fisiológica de NaCl 0,9 % (p/v) estéril. A suspensão de micélio homogeneizado foi diluída também em solução fisiológica estéril até se obter densidade óptica entre 0,4 e 0,5 a 400 nm, o que corresponde a aproximadamente 200 a 260 μg de micélio seco/mL de suspensão de micélio (BARBOSA et al., 2003).

4.4.3 Preparo dos Meios e Cultivo do Microrganismo

Os cultivos líquidos foram desenvolvidos no meio mínimo de Vogel (1956), acrescido de glucose como fonte de carbono na concentração de 50 g/L, exceto quando especificado no protocolo experimental. Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL, guardando-se a proporção ar/meio de 5:1. Para cada 100 mL de meio de cultivo foram utilizados 4 mL de inóculo com a densidade óptica padronizada, exceto no experimento de otimização por metodologia de superfície de resposta. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante em incubadora orbital a 180 rpm, durante os intervalos de tempo determinados no delineamento experimental, à temperatura de 28 ± 2 °C (BARBOSA et al., 2003).

4.5 PARÂMETROS AVALIADOS NA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA

4.5.1 Efeito do Tempo de Cultivo

A escolha do tempo de cultivo para produção de botriosferana foi feita a partir de experimentos de cultivos líquidos, na presença de 10 mL/L de óleo de soja. Os cultivos foram desenvolvidos em triplicata e interrompidos nos intervalos de tempo de 48 a 216 horas. Uma curva controle sem óleo foi realizada paralelamente, e os cultivos interrompidos nos mesmos intervalos mencionados.

4.5.2 Influência do Fornecedor de Óleo de Soja na Produção de Botriosferana

Cultivos líquidos foram desenvolvidos em triplicata para avaliar a produção de botriosferana na presença de diferentes preparações comerciais de óleo de soja. Foram inoculados meios contendo 10 mL/L de óleo de soja das marcas Soya, ou Liza, ou Cocinero, que permaneceram incubados durante 144 horas. Paralelamente foi inoculado um cultivo controle sem óleo.

4.5.3 Produção de Botriosferana na Presença de Óleo de Soja Conservado com TBHQ, Óleo de Babaçu e Etanol

O óleo de soja da marca Soya envasado em frasco de polietileno contendo o conservante *tert*-butil hidroxiquinona (TBHQ), óleo de babaçu e etanol foram testados para verificar seus efeitos na produção de botriosferana. O experimento de cultivo líquido foi desenvolvido em meio contendo 10 mL/L de óleo de soja, ou 10 mL/L de óleo de babaçu ou 20 mL/L de etanol absoluto. Paralelamente foi inoculado um cultivo controle sem nenhum dos componentes mencionados anteriormente. Os cultivos foram desenvolvidos em triplicata, durante 144 horas de tempo de cultivo.

4.5.4 Efeito do Tensoativo Tween[®] 80 na Produção de Botriosferana

Cultivos líquidos foram desenvolvidos em triplicata para avaliar a produção de botriosferana na presença de óleo de soja e do tensoativo monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80). Foram inoculados meios contendo 2 g/L de Tween 80, ou 2 g/L de Tween 80 acrescido de 10 mL/L de óleo de soja, que permaneceram incubados durante 144 horas. Paralelamente foi inoculado um cultivo controle sem tensoativo e sem óleo.

4.5.5 Efeito do pH Inicial na Produção de Botriosferana

Experimentos em meio líquido foram realizados para avaliar os efeitos do pH inicial do meio na produção de botriosferana, na presença de 10 mL/L de óleo de soja. Os valores testados foram 4,0; 5,0; e 7,0, corrigidos pela adição de HCl 1 M ou NaOH 1 M previamente à esterilização. Em paralelo, foi realizado um controle sem correção de pH, cujo valor permaneceu conforme fornecido pelo meio mínimo de Vogel (5,8).

4.6 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE BOTRIOSFERANA DO MEIO DE CULTIVO

Em experimento desenvolvido em triplicata, foram testados dois protocolos de interrupção de extração de EPS, esquematizados nos diagramas apresentados na Figura 2.

O protocolo I (Figura 2A) consistiu de centrifugação a $7150\times g$ durante 30 minutos. O sobrenadante foi reservado para as determinações analíticas e precipitação do EPS, e o micélio foi ressuscitado em 100 mL de água destilada. A suspensão de micélio foi centrifugada a $7150\times g$ por 15 minutos, o sobrenadante da segunda centrifugação foi reunido ao primeiro, e o material foi precipitado com três volumes de etanol absoluto. O micélio lavado foi separado para determinação do crescimento micelial. Esse foi o protocolo adotado em todos os experimentos.

O protocolo II (Figura 2B) envolveu adição de 100 mL de água destilada ao cultivo, homogeneização, filtração e coleta do micélio em papel de filtro dessecado e tarado, para determinação do crescimento micelial, e precipitação do EPS contido no filtrado com 3 volumes de etanol absoluto.

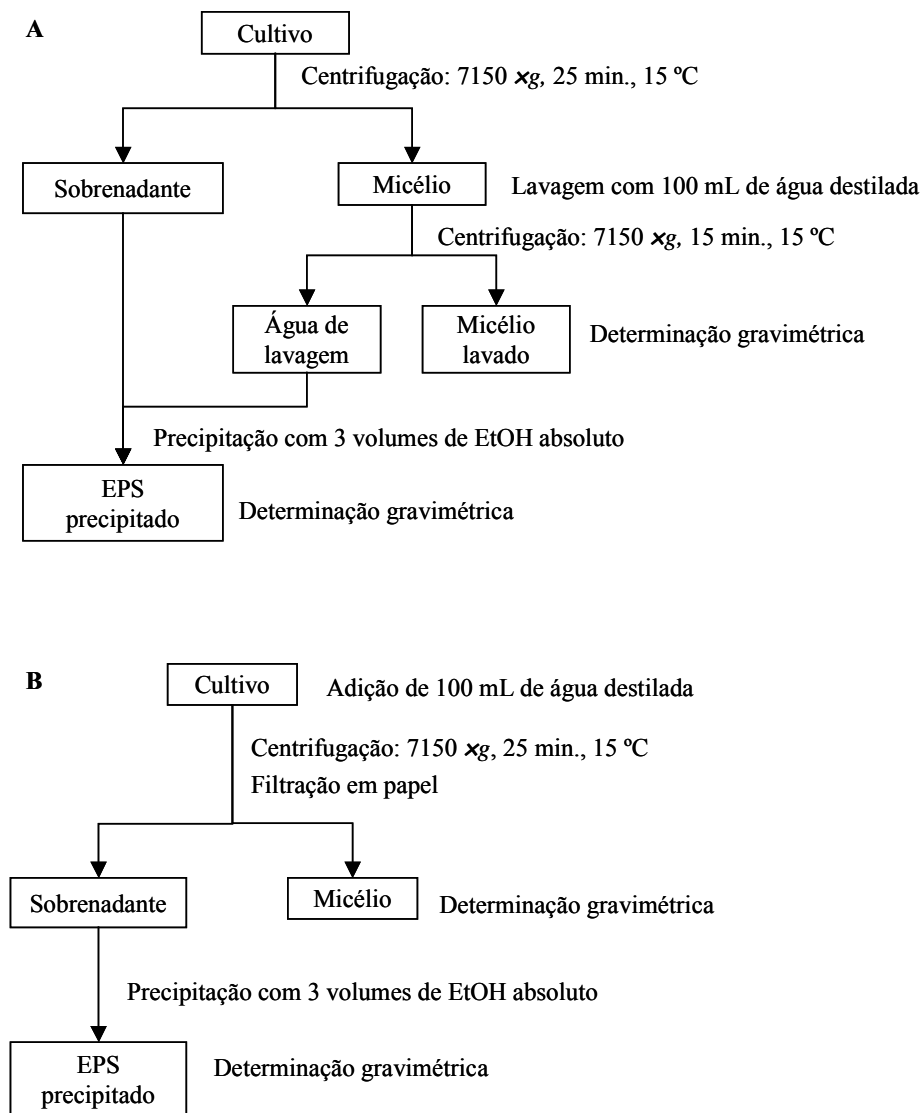


Figura 2 – Protocolos de extração de botriosferana do meio de cultivo submerso de *B. rhodina* A) Protocolo I; B) Protocolo II

4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA ATRAVÉS DE EXPERIMENTOS FATORIAIS E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

4.7.1 Primeira Triagem de Variáveis

A significância dos efeitos das variáveis tempo de cultivo, tamanho do inóculo, concentração de glucose e concentração de Tween 80 na produção de botriosferana, na presença de 10 mL/L de óleo de soja, foi avaliada em experimentos em cultivos submersos.

Foi utilizado um delineamento fatorial para quatro variáveis em dois níveis (2^4 pontos fatoriais), dividido em dois blocos representando dois inóculos distintos, obtidos a partir de diferentes placas de cultivo sólido. Os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória dentro de cada bloco. O delineamento foi adicionado de dois pontos centrais por bloco, totalizando 20 experimentos (Tabela 1), e permitiu obter um modelo ajustado de primeira ordem contendo efeitos lineares e interações binárias.

Tabela 1 – Delineamento fatorial 2^4 em dois blocos para avaliar os efeitos das variáveis independentes tempo de cultivo, volume de inoculo padrão, concentração de glucose e concentração de Tween 80

Experimento	Bloco	Fator			
		x_1	x_2	x_3	x_4
1	2	-1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	-1	-1
3	1	-1	1	-1	-1
4	2	1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	-1
6	2	1	-1	1	-1
7	2	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	1
10	2	1	-1	-1	1
11	2	-1	1	-1	1
12	1	1	1	-1	1
13	2	-1	-1	1	1
14	1	1	-1	1	1
15	1	-1	1	1	1
16	2	1	1	1	1
17 (C)	1	0	0	0	0
18 (C)	1	0	0	0	0
19 (C)	2	0	0	0	0
20 (C)	2	0	0	0	0
Fatores	Valores reais				
	-1	0	+1		
x_1 , tempo de cultivo (h)	72	120	168		
x_2 , volume do inóculo padrão (mL)	1	4	7		
x_3 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50		
x_4 , concentração de Tween 80 (g/L)	1	3	5		

4.7.2 Segunda Triagem de Variáveis

Cultivos líquidos foram desenvolvidos para avaliar a significância dos efeitos das variáveis pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e concentração

de Tween 80 na produção de botriosferana, mantendo fixos o tamanho do inóculo em 4 mL e tempo de cultivo em 72 horas.

A correção do pH inicial foi feita previamente à esterilização do material, pela adição de HCl 1 M. O valor do nível +1 do pH inicial (5,7) utilizado no delineamento foi fornecido pelo meio mínimo de Vogel adicionado de Tween 80, sem correção. Foi utilizado o mesmo delineamento da primeira triagem de variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Delineamento fatorial 2^4 em dois blocos para avaliar os efeitos das variáveis independentes pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e concentração de Tween 80

Experimento	Bloco	Fator			
		x_1	x_2	x_3	x_4
1	2	-1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	-1	-1
3	1	-1	1	-1	-1
4	2	1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	-1
6	2	1	-1	1	-1
7	2	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	1
10	2	1	-1	-1	1
11	2	-1	1	-1	1
12	1	1	1	-1	1
13	2	-1	-1	1	1
14	1	1	-1	1	1
15	1	-1	1	1	1
16	2	1	1	1	1
17 (C)	1	0	0	0	0
18 (C)	1	0	0	0	0
19 (C)	2	0	0	0	0
20 (C)	2	0	0	0	0
Fatores	Valores reais				
	-1	0	+1		
x_1 , valor de pH inicial	4,3	5,0	5,7		
x_2 , concentração de óleo (mL/L)	0	5	10		
x_3 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50		
x_4 , concentração de Tween 80 (g/L)	1	3	5		

4.7.3 Otimização da Produção de Botriosferana por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Foi utilizado um delineamento Box-Behnken (MONTGOMERY, 2005) para três variáveis em três níveis, totalizando 15 experimentos, dos quais três são repetições do ponto central (Tabela 3). O delineamento de superfície de resposta em três níveis permitiu obter um modelo ajustado de segunda ordem, contendo efeitos lineares e quadráticos, bem como interações binárias. Cultivos líquidos inoculados com 7 mL do inóculo padrão foram incubados por 72 horas.

Tabela 3 – Delineamento Box-Behnken para 3 variáveis em 3 níveis

Experimento	Fator		
	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13 (C)	0	0	0
14 (C)	0	0	0
15 (C)	0	0	0

Fatores	Valores reais		
	-1	0	+1
x_1 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50
x_2 , concentração de óleo (mL/L)	0	5	10
x_3 , concentração de Tween 80 (g/L)	0	2,5	5

4.8 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BOTRIOSFERANA PRODUZIDA NA CONDIÇÃO ÓTIMA

Foram desenvolvidos cultivos na condição otimizada obtida por MSR, em meio mínimo de Vogel contendo 40 g/L de glucose, 10 mL/L de óleo de soja e 4,5 g/L de Tween 80, incubados durante 72 horas em incubadora orbital a 28 ± 2 °C, 180 rpm. O sobrenadante do cultivo foi separado por centrifugação a $7150 \times g$ durante 25 minutos, tratado com três volumes de etanol absoluto e mantido em repouso a 4 °C para precipitação da botriosferana. A botriosferana precipitada foi coletada, solubilizada em água destilada e dialisada exaustivamente contra água deionizada para remoção do etanol. A seguir, a botriosferana foi congelada e liofilizada.

Com o EPS liofilizado foi preparada uma solução contendo 0,5 g/L de açúcares totais determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956), que foi utilizada nos experimentos de cromatografia de filtração em gel e hidrólise ácida total.

4.8.1 Cromatografia de filtração em gel

Uma alíquota da solução de botriosferana foi submetida a três ciclos de precipitação com etanol absoluto (3 volumes) e ressolubilização em água destilada, e finalmente a amostra com um volume de 1800 μ L contendo aproximadamente 900 μ g de açúcares totais foi aplicada em uma coluna de $2,5 \times 46$ cm empacotada com gel Sepharose CL 4B, e eluída a temperatura ambiente com água destilada em taxa de fluxo de 1,2 mL/min. O volume de eluição do *Blue dextran*, correspondendo a moléculas de aproximadamente 2000 kDa, foi 75 mL, e o volume coletado em cada fração foi 3,8 mL. O pico foi detectado pela determinação de açúcares totais nas frações.

4.8.2 Hidrólise ácida total e cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC)

Uma alíquota do EPS solúvel contendo 20 µg de açúcares totais foi congelada e liofilizada, e a seguir tratada com 300 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5 M, e mantida a 100 °C por 16 horas para hidrólise total do polissacarídeo e liberação dos monossacarídeos constituintes. Após a hidrólise, o TFA foi removido por evaporação, e o resíduo foi solubilizado em água deionizada e evaporado mais três vezes para remoção completa do TFA. Finalmente, o hidrolisado foi concentrado em um volume de aproximadamente 250 µL e utilizado nas análises de HPAEC.

Foram feitas diluições adequadas do hidrolisado de maneira a se obter aproximadamente 200 ng de açúcares totais em uma alíquota de 25 µL, que foi injetada no sistema cromatográfico. A eluição foi feita com NaOH 14 mM à pressão de 980 psi e temperatura ambiente, e a detecção foi realizada com atenuação de 1024. A identificação dos monossacarídeos no hidrolisado foi feita por comparação aos os tempos de retenção de padrões de monossacarídeos.

4.8.3 Espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR)

Uma amostra do EPS seco contendo 1 mg de açúcares totais foi triturada com 300 mg de KBr e comprimida em um disco, que foi utilizado para determinação do espectro FTIR no intervalo de 1650 a 600 cm^{-1} e resolução 2 cm^{-1} .

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os testes estatísticos de diferenças entre médias, análise de variância (ANOVA) e análises de regressão foram realizados ao nível de significância $\alpha = 5 \%$, utilizando o programa Statistica (Statsoft, Inc.) versão 5.1. As diferenças entre as médias dos

tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 5 \%$), exceto quando outros testes tenham sido aplicados.

4.10 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As determinações analíticas foram feitas empregando-se os seguintes métodos:

- I. Crescimento micelial por gravimetria: o micélio lavado foi transferido para recipientes de lâmina de alumínio previamente pesados e seco em estufa a 70 °C até peso constante (aproximadamente 72 horas). Após esse período, as amostras foram mantidas em dessecador até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente, e tiveram o peso determinado em balança analítica.
- II. Botriosferana por gravimetria: o sobrenadante do cultivo e a água de lavagem do micélio foram tratados com três volumes de etanol e mantidos em repouso por 24 horas em câmara fria a 4 °C. A seguir, o EPS precipitado foi filtrado a vácuo e coletado em papel de filtro dessecado e pré-tarado, e seco em estufa a 70 °C até peso constante (aproximadamente 24 horas). Após esse período, as amostras foram mantidas em dessecador até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente, e tiveram o peso determinado em balança analítica.
- III. Glucose residual pelo método fotométrico enzimático (glucose oxidase), no intervalo de 0,1 a 0,5 g/L de glucose livre.
- IV. Açúcares totais pela técnica reduzida do método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956) utilizando 500 μ L de volume de amostra.
- V. Proteínas pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA

5.1.1 Efeito da Adição de Óleo e do Tempo de Cultivo na Produção de Botriosferana

Em experimentos de cultivo submerso de *Acremonium persicinum*, Stasinopoulos e Seviour (1990) observaram que a adição de 0,12 g/L de óleo de girassol ao meio de cultivo permitiu a produção de β -glucana em menor tempo de cultivo, e em maior quantidade. Yang e colaboradores (2000) observaram uma redução de 4 para 2 dias na fase *lag* do cultivo de *Ganoderma lucidum* na presença de 1 g/L de ácido palmítico, um dos constituintes do óleo de soja, bem como um aumento de cerca de 40 % na produção de β -glucana.

Com o objetivo de estudar o efeito do tempo de cultivo e da adição de óleo ao meio, foi feita uma curva de produção de botriosferana por *B. rhodina* na ausência e na presença de óleo. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

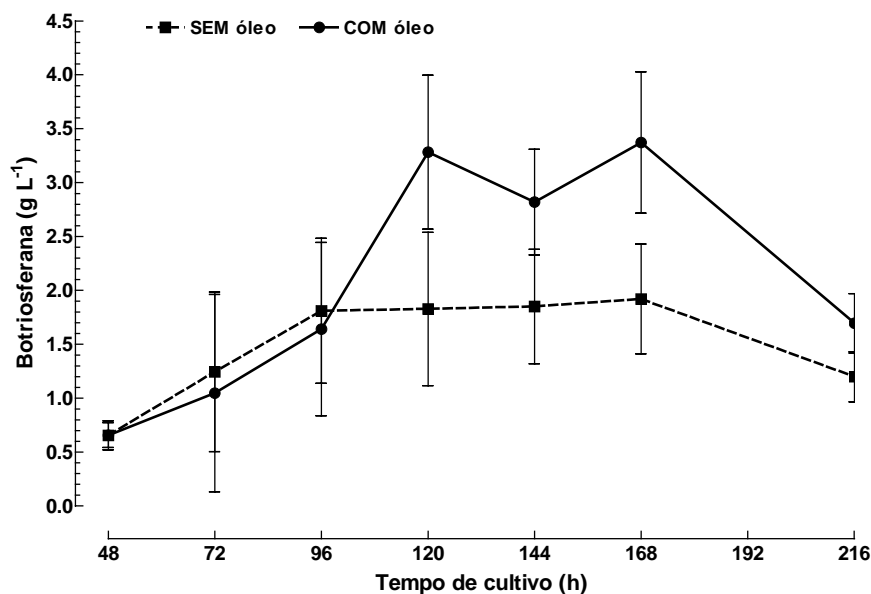


Figura 3 – Efeito do tempo de cultivo na produção de botriosferana na ausência e na presença de 10 mL/L de óleo de soja

Esses resultados permitem observar uma tendência à produção constante de EPS no intervalo de tempo compreendido entre 120 e 168 horas, visto que as diferenças entre os valores médios, nos cultivos tanto na presença quanto na ausência de óleo, em cada ponto do referido intervalo (120, 144 e 168 horas) não foram significativas ($p > 0,10$). Os valores de produção de EPS no intervalo foram de $3,16 \pm 0,62$ g/L no cultivo com óleo, e $1,87 \pm 0,54$ g/L no controle sem óleo. Devido à tendência observada, o tempo de cultivo escolhido para os experimentos subseqüentes foi de 144 horas.

Neste experimento ficou também evidente que a adição de óleo levou a um aumento (cerca de 70 %) na produção de botriosferana por *B. rhodina*. Na literatura científica ainda não se encontra descrita a influência do óleo de soja na produção de botriosferana por este ascomiceto.

Outros autores, no entanto, já obtiveram resultados semelhantes para outros óleos e microrganismos. Stasinopoulos e Seviour (1990) cultivaram *Acremonium persicinum* na presença de óleo de oliva ou de girassol, e observaram aumento de cerca de 77 % na produção de β -glucana, mesmo em concentrações baixas de óleo como 0,4 g/L. No cultivo de *Aureobasidium pullulans* para a produção de pululana, West e Reed-Hamer (1995) observaram aumento de 33 % na produção do EPS quando o meio de cultivo foi suplementado com 2 g/L de óleo de soja ou óleo de milho, e Youssef e colaboradores (1998) duplicaram a produção desse exopolissacarídeo em cultivos com 25 mL/L de óleo de oliva.

Os trabalhos encontrados na literatura científica sobre produção de exopolissacarídeos na presença de óleos vegetais referem-se a estudos de efeitos de óleos de diferentes fontes vegetais, bem como diferentes ácidos graxos livres. Esses trabalhos, no entanto, não avaliaram os efeitos de óleos de uma mesma fonte vegetal, adquiridos de diferentes fornecedores, ou ainda formulações contendo diferentes conservantes de grau alimentício.

5.1.2 Influência do Fornecedor de Óleo de Soja na Produção de Botriosferana

Com o objetivo de estudar diferenças entre óleos de soja de procedências diversas, foram utilizados neste trabalho óleos de três marcas comercialmente disponíveis, e avaliados os seus efeitos na produção de botriosferana. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Produção de botriosferana por *B. rhodina* em 10 mL/L de óleos de diferentes procedências, em 144 horas de tempo de cultivo

Grupo	EPS (g/L)	média	desvio-padrão
Soya	3,340	3,44	0,11
	3,554		
	3,431		
Liza	3,925	3,85	0,09
	3,744		
	3,877		
Cocinero	3,359	3,31	0,16
	3,137		
	3,436		
controle sem óleo	2,112	2,14	0,05
	2,195		
	2,107		

Esses valores permitiram confirmar que a adição de óleo aumentou a produção de botriosferana, visto que todas as marcas de óleo de soja promoveram aumento significativo da produção deste EPS em relação ao grupo controle sem óleo ($p < 0,001$ para o teste F). Análises posteriores dos resultados pelo teste de Tukey mostraram que os óleos das marcas Soya e Cocinero não apresentaram diferença entre si ($p = 0,49$), e que o óleo da marca Liza foi o que promoveu o maior aumento na produção de EPS, superior aos demais grupos ($p < 0,01$). Dessa forma, o óleo de soja da marca Liza foi escolhido para todos os demais experimentos.

Esses resultados referem-se a experimentos utilizando preparações de óleo de soja que contêm somente ácido cítrico ou tocoferol como aditivos. Óleos de soja de grau alimentício, no entanto, podem conter diferentes antioxidantes que são adicionados para melhorar sua estabilidade e resistência à rancificação oxidativa. Entre os antioxidantes utilizados nas formulações comercialmente disponíveis no Brasil estão, além do ácido cítrico e tocoferol mencionados anteriormente, o conservante *tert*-butil hidroquinona (TBHQ).

5.1.3 Produção de Botriosferana na Presença de Óleo de Soja Conservado com TBHQ, Óleo de Babaçu e Etanol

Com o objetivo de comparar efeitos de diferentes antioxidantes, foi utilizado neste experimento uma formulação de óleo de soja contendo TBHQ, da marca Soya, e o resultado comparado aos obtidos anteriormente com outras formulações que não continham este antioxidante. Foi também testado o óleo de babaçu, que contém predominantemente os ácidos láurico (C12), mirístico (C14) e oléico (C18:1) (GUNSTONE et al., 1994).

Neste experimento foi também avaliado o efeito da adição de etanol, baseando-se nos resultados de Yang e colaboradores (2004), que duplicaram a produção de expolissacarídeo por *Ganoderma lucidum* pela adição de 20 mL/L de etanol ao meio de cultivo. Os resultados da produção de EPS na presença desses compostos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Produção de botriosferana em óleo de soja (10 mL/L), babaçu (10 mL/L) e etanol (20 mL/L), em 144 horas de cultivo.

Grupo	EPS (g/L)	média	desvio-padrão
Soja	3,454	2,97	0,58
	3,121		
	2,322		
Babaçu	4,370	3,31	0,93
	2,918		
	2,632		
Etanol	1,280	1,26	0,12
	1,373		
	1,130		
controle sem aditivos	2,231	1,88	0,31
	1,741		
	1,661		

Pode-se observar que a adição de etanol ao meio de cultivo não causou diferença significativa na produção de botriosferana em relação ao controle ($p = 0,58$). Diferentemente, os óleos de soja e de babaçu aumentaram em cerca de 60 % a produção do EPS ($p < 0,05$ para o teste de Fisher), sem apresentarem diferenças entre si ($p = 0,88$ para o teste de Tukey e $p = 0,49$ para o teste de Fisher). Nenhum trabalho na literatura científica

relatou o uso de óleo de babaçu na produção de exopolissacarídeo, ou mais especificamente, de β -D-glucanas.

Ainda, não foi observada diferença significativa na produção de botriosferana na presença do óleo de soja testado neste experimento, que continha o conservante TBHQ, em relação a outros óleos avaliados anteriormente ($p > 0,25$ para diferença entre o óleo deste experimento e os óleos Soya e Cocinero do experimento anterior). No entanto, o óleo da marca Liza, testado anteriormente, ainda foi superior ao óleo contendo TBHQ utilizado neste experimento ($p < 0,05$), com uma produção de EPS 30 % maior.

Portanto, optou-se por dar continuidade no uso do óleo de soja (marca Liza) para os demais experimentos, visto se tratar de um material amplamente disponível. Um diagrama geral mostrando os resultados de produção de EPS na presença de etanol e de todos os óleos estudados, em perspectiva com o controle sem adição desses componentes está na Figura 4.

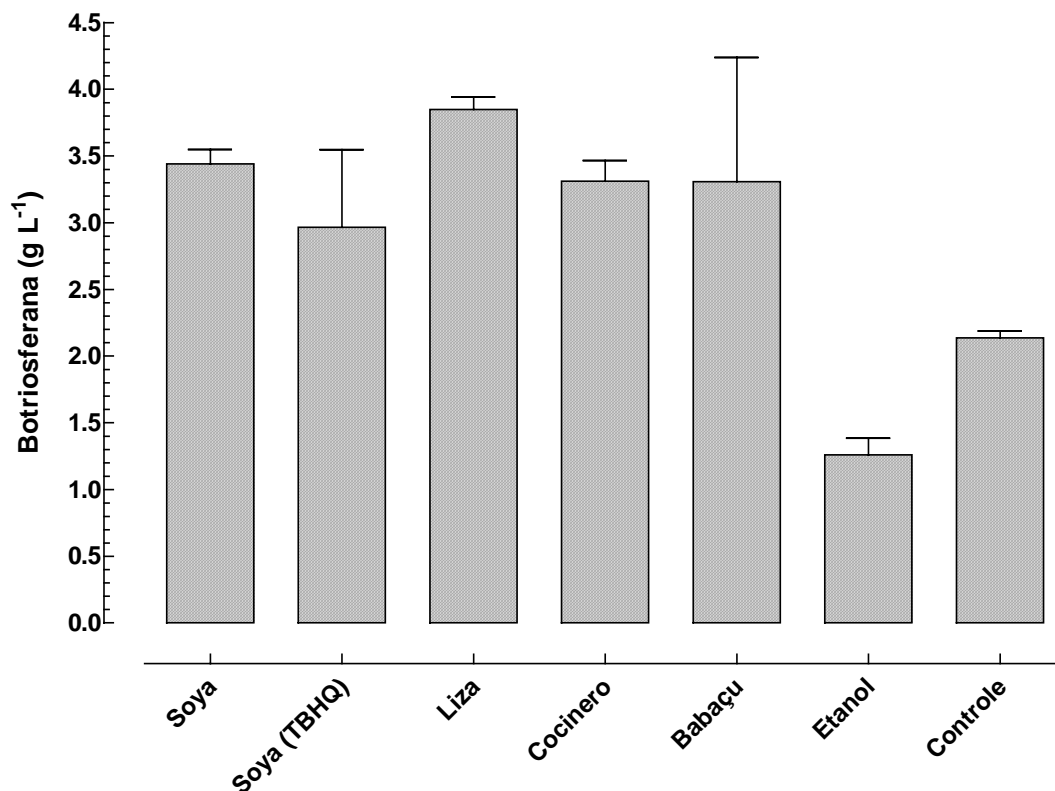


Figura 4 –. Produção de botriosferana na presença de etanol e diferentes óleos; $n = 3$; $p < 0,001$

5.1.4 Efeito do Tenssoativo Tween 80 na Produção de Botriosferana

West e Reed-Hamer (1995) avaliaram o efeito de óleos e tensoativos na produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023. A adição de óleos vegetal, ácidos graxos e tensoativos aumentou a produção de pululana, assim como a do antiespumante 204. De acordo com Stasinopoulos e Seviour (1990), óleos e tensoativos podem alterar a permeabilidade da membrana celular do fungo ou aumentar a expressão do gene que codifica as enzimas que sintetizam o EPS.

Por outro lado, West e Reed-Hamer (1994) demonstraram que agentes antifúngicos que afetavam a permeabilidade da membrana celular podem ser usados no isolamento de mutantes com síntese elevada de polissacarídeo.

Considerando que ainda não havia sido avaliado o efeito da adição de tensoativos na produção de botriosferana, optou-se por verificar o efeito da adição de Tween 80 e óleo de soja, na produção deste EPS em relação ao controle (sem adição de óleo e tensoativo), conforme mostram os resultados da Tabela 6.

Tabela 6 – Produção de botriosferana e de biomassa fúngica na presença de óleo e tensoativo, em 144 horas

Grupo	pH final	média DP*		Biomassa fúngica		EPS	
				Concentração (g/L)	média DP*	Concentração (g/L)	média DP*
Tween	6,35			15,176		3,130	
	6,40	6,39	0,04	15,396	15,05 0,42	3,040	3,25 0,29
	6,43			14,586		3,583	
Tween + óleo	5,98			18,615		4,019	
	6,04	6,00	0,04	18,405	18,21 0,52	4,214	4,16 0,12
	5,97			17,622		4,248	
controle sem Tween e sem óleo	6,48			14,912		1,725	
	6,31	6,37	0,09	15,007	14,86 0,18	1,910	1,94 0,23
	6,33			14,664		2,176	

(*) DP = desvio-padrão

Os resultados da Tabela 6 demonstraram que o tensoativo isoladamente proporcionou um aumento próximo de 68 % na produção de botriosferana em relação ao

controle ($p < 0,01$). A adição de óleo e tensoativo promoveu aumento ainda maior, cerca de 200 %, na produção de EPS em relação ao controle ($p < 0,01$).

A produção de biomassa fúngica não foi afetada pela adição de Tween 80 isoladamente, visto que não foi observada diferença significativa entre os grupos Tween e Controle ($p = 0,83$). No entanto, a adição de óleo juntamente com o tensoativo proporcionou aumento de 23 % no crescimento micelial ($p < 0,001$).

Portanto, esses resultados indicaram que o uso de Tween 80 aumentou a produção de botriosferana, porém não promoveu aumento de biomassa fúngica, o que sugere que este tensoativo provavelmente tenha efeito somente sobre a liberação do EPS para o meio de cultivo. Por outro lado, o aumento na produção de botriosferana observado na presença de óleo e Tween 80 parece estar relacionado a um aumento da biomassa fúngica, sugerindo uma contribuição adicional do óleo tanto na síntese de EPS quanto na reprodução microbiana. Na Figura 5 pode ser comparado o perfil de produção do EPS botriosferana e da biomassa fúngica nesses diferentes tratamentos.

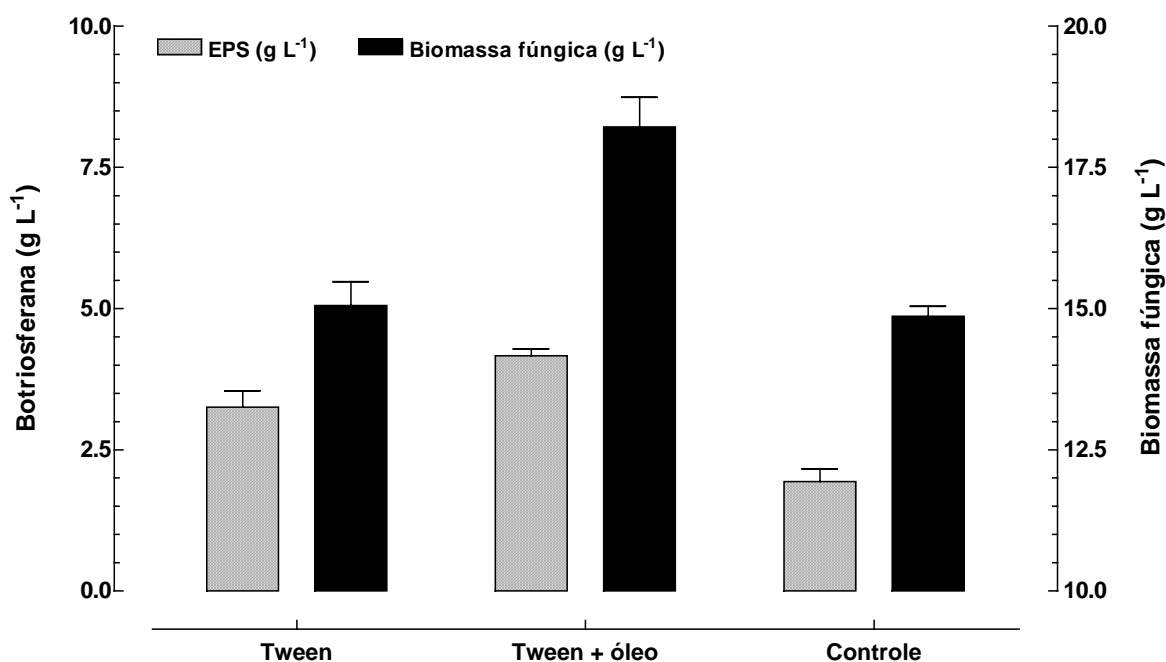


Figura 5 – Perfil de produção do EPS botriosferana e de biomassa fúngica na ausência e na presença de Tween 80, com ou sem óleo de soja; $n = 3$; $p < 0,001$

Steluti e colaboradores (2004) constataram que em 48 horas o pH do meio de cultivo de *B. rhodina* tem uma queda acentuada, seguida de um aumento que coincidiu

com a produção de biomassa fúngica e de botriosferana. Esses mesmos pesquisadores observaram que a botriosferana pode ser produzida em diferentes fontes de carbono tais como frutose, sacarose, melação de cana de açúcar, manose, além de glucose. O valor final de pH em 72 horas de cultivos foi, no entanto, mais baixo que o inicial, para a maioria das fontes de carbono estudadas.

Em 144 horas de cultivo, e na presença de óleo de soja e Tween 80, o pH final do meio de cultivo de *B. rhodina*, no entanto, aumenta, conforme pôde ser observado nos resultados dos experimentos com adição de óleo e Tween 80 (Tabela 6).

Para avaliar o efeito do pH inicial na produção de botriosferana na presença de 10 mL/L de óleo de soja, foram desenvolvidos experimentos em quatro valores de pH inicial: 5,8 (controle); 4,0; 5,0 e 7,0.

5.1.5 Efeito do pH Inicial na Produção de Botriosferana na Presença de 10 mL/L de Óleo de Soja Durante 144 Horas de Cultivo

Informações sobre o efeito do pH inicial em cultivos para a produção de exopolissacarídeos na presença de óleos vegetais e ácidos graxos são escassas na literatura. Em um estudo da produção de pululana por *Aureobasidium pullulans*, Youssef e colaboradores (1998) apenas salientaram que o pH inicial utilizado na produção deste exopolissacarídeo foi 5,5. O valor de pH inicial de 4,0 foi utilizado por Yang e colaboradores (2000), que estudaram a produção de β -glucana por *Ganoderma lucidum*. Park e colaboradores (2002) também estudaram a produção de biopolímeros extracelulares por *Cordyceps militaris*, e utilizaram pH 6,0.

Com o objetivo de estudar o efeito do pH inicial do meio de cultivo de *B. rhodina* para a produção de botriosferana na presença de óleo, em 144 horas de cultivos, foi desenvolvido o experimento cujos resultados estão na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7 – Produção de botriosferana e de biomassa fúngica em diferentes valores de pH inicial, na presença de 10 mL/L de óleo de soja

pH inicial	Biomassa fúngica			EPS		
	Concentração (g/L)	média	DP*	Concentração (g/L)	média	DP*
4,0	14,879	14,82	0,76	0,492	0,50	0,15
	14,027			0,660		
	15,551			0,359		
5,0	17,222	16,91	0,35	0,800	0,82	0,16
	16,533			0,987		
	16,983			0,676		
7,0	16,145	16,29	0,13	1,793	1,70	0,11
	16,364			1,581		
	16,371			1,714		
5,8 (controle)	18,183	18,32	0,22	1,833	1,75	0,26
	18,573			1,461		
	18,216			1,962		

(*) DP = desvio-padrão

A variação do pH inicial teve efeito significativo sobre o conjunto das respostas analisadas, conforme demonstrado pelo teste multivariado de Wilks ($p < 0,001$). Este teste foi utilizado para avaliar o efeito global da variável independente pH inicial sobre o conjunto de variáveis dependentes EPS e biomassa (HAIR et al., 2005).

Não houve diferença entre as médias da produção de EPS no grupo controle (pH 5,8) e o grupo pH 7 ($p = 0,98$). Entretanto, as médias dos grupos pH 4 e 5 foram significativamente inferiores às dos grupos controle e pH 7 ($p < 0,01$ para ambos). O abaixamento do pH inicial teve efeito negativo sobre a produção de botriosferana, portanto nos experimentos posteriores, foi mantido o pH inicial de 5,8 característico do meio mínimo de Vogel sem correção.

Também pôde ser observado que alterações no pH inicial, tanto no sentido ácido quanto alcalino, afetaram significativamente o crescimento do fungo, visto que a média do grupo controle (pH não modificado) foi superior às dos demais grupos ($p < 0,05$).

Vários experimentos foram desenvolvidos na presença de concentrações crescentes de óleo de soja (5 a 70 mL/L, dados não apresentados). A partir de 15 mL/L observou-se que o EPS produzido era de difícil extração, ficando sua maior parte vinculada à biomassa micelial e pequena quantidade permanecia no sobrenadante. Esses problemas

técnicos apontaram para a necessidade de uma padronização do protocolo de extração do EPS do meio de cultivo, conforme descrito no item 4.6 da seção de Material e Métodos.

5.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE BOTRIOSFERANA DO MEIO DE CULTIVO

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos em cultivos com 10 mL/L de óleo de soja, ou sem adição do óleo (controle). Cabe salientar que no Protocolo I o sobrenadante obtido na centrifugação dos cultivos foi reunido com a primeira e única água de lavagem do micélio e esse material foi tratado com 3 volumes de etanol, e no Protocolo II os cultivos foram diluídos em 100 mL de água destilada, e todo o material foi centrifugado e o sobrenadante tratado com 3 volumes de etanol (Figura 2).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da produção de botriosferana e biomassa fúngica, determinados após execução dos protocolos I e II.

Tabela 8 – Comparação da produção de botriosferana e biomassa fúngica, determinadas após execução dos protocolos de extração I e II

Protocolo		Biomassa fúngica		EPS	
		Concentração (g/L) média DP*		Concentração (g/L) média DP*	
I	Óleo	18,903		3,184	
		19,089	19,16 0,30	3,317	3,24 0,07
		19,499		3,230	
	controle sem óleo	13,062		2,266	
		13,410	13,38 0,31	2,287	2,25 0,06
		13,672		2,182	
II	Óleo	19,837		2,874	
		19,153	19,75 0,56	2,762	2,90 0,14
		20,264		3,049	
	controle sem óleo	14,847		2,240	
		15,420	15,01 0,35	2,661	2,28 0,36
		14,774		1,936	

(*) DP = desvio-padrão

Os diferentes tratamentos tiveram efeito significativo sobre o conjunto das respostas, o que foi demonstrado pelo teste multivariado de Wilks ($p < 0,001$). Os dois protocolos testados não apresentaram diferença significativa na extração de EPS do meio de cultivo, quando comparados através dos valores de produção de botriosferana determinados nos grupos contendo óleo ($p = 0,22$) e nos grupos controle ($p = 1$). No entanto, devido ao fato de os resultados para o protocolo I apresentarem menor dispersão, demonstrado pelo desvio-padrão mais baixo, esse protocolo foi padronizado para a extração de botriosferana em todos os experimentos posteriores.

Os parâmetros de cultivo estudados até o momento foram avaliados através da abordagem clássica de um fator por vez. Os resultados obtidos foram importantes para determinar a contribuição de cada um desses fatores na produção de botriosferana. No entanto, o uso de experimentos fatoriais permite estudar mais de um fator por vez (item 4.7), racionalizando o uso de recursos como tempo, equipamentos e reagentes, bem como fornece informações a respeito de potenciais interações existentes entre fatores, que podem ser mais facilmente identificadas e discutidas através desta abordagem.

Não constam da literatura científica, até o momento, relatos de uso de experimentos fatoriais para se estudar os efeitos de parâmetros de cultivo de fungos para a

produção de polissacarídeos na presença de óleos vegetais. Com o objetivo de otimizar a produção de botriosferana na presença de óleo de soja e do tensoativo Tween 80, inicialmente foi feita uma triagem de variáveis, através de delineamentos fatoriais em dois níveis, que permitiram criar modelos ajustados de primeira ordem contendo interações binárias. Numa segunda etapa, foi feita a otimização das condições de cultivo, pelo uso de um delineamento em três níveis, que permitiu criar um modelo mais complexo, de segunda ordem. Os resultados estão apresentados na seção 5.3 a seguir.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA ATRAVÉS DE EXPERIMENTOS FATORIAIS E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

5.3.1 Primeira Triagem de Variáveis

A primeira triagem de variáveis foi feita utilizando-se um delineamento fatorial 2^4 em dois blocos, que representam duas inoculações diferentes, adicionado de dois pontos centrais por bloco. A concentração de óleo foi fixada em 10 mL/L, e o pH inicial foi de 5,7. Os parâmetros de cultivo estudados foram tempo de cultivo, volume de inóculo padrão, concentração de glucose e concentração de Tween 80, e os resultados obtidos estão na Tabela 9.

Tabela 9 – Respostas observadas no delineamento fatorial 2^4 em dois blocos, para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo, volume de inóculo padrão, concentração de glucose e concentração de Tween 80

Experimento	Ordem aleatória	Bloco	Variável				EPS (g/L)	EPS*	Biomassa (g/L)	pH final*
			x_1	x_2	x_3	x_4				
2	9	1	1	-1	-1	-1	0,77	0,88	14,00	6,52
3	2	1	-1	1	-1	-1	1,29	1,13	11,53	3,97
5	10	1	-1	-1	1	-1	2,88	1,70	9,62	3,15
8	7	1	1	1	1	-1	4,19	2,05	19,91	6,00
9	5	1	-1	-1	-1	1	3,01	1,73	4,66	3,46
12	3	1	1	1	-1	1	0,93	0,96	16,28	6,74
14	6	1	1	-1	1	1	4,06	2,01	20,74	5,56
15	1	1	-1	1	1	1	9,40	3,07	16,21	4,66
17 (C)	8	1	0	0	0	0	2,45	1,56	17,46	5,95
18 (C)	4	1	0	0	0	0	2,76	1,66	17,77	5,79
1	14	2	-1	-1	-1	-1	1,53	1,24	10,35	3,68
4	15	2	1	1	-1	-1	0,14	0,37	13,88	6,76
6	19	2	1	-1	1	-1	3,82	1,95	19,33	5,56
7	12	2	-1	1	1	-1	5,97	2,44	19,89	4,33
10	20	2	1	-1	-1	1	0,75	0,87	16,12	6,58
11	11	2	-1	1	-1	1	2,34	1,53	10,80	4,61
13	18	2	-1	-1	1	1	8,66	2,94	11,47	3,96
16	16	2	1	1	1	1	4,63	2,15	20,96	5,20
19 (C)	13	2	0	0	0	0	2,63	1,62	17,69	5,42
20 (C)	17	2	0	0	0	0	2,50	1,58	17,64	5,50
Fatores	Valores reais									
	-1	0	+1							
x_1 , tempo de cultivo (h)	72	120	168							
x_2 , volume do inóculo padrão (mL)	1	4	7							
x_3 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50							
x_4 , concentração de Tween 80 (g/L)	1	3	5							

(*) Resultado da transformação de Box-Cox da resposta EPS (g/L); $\lambda = 0,5$

(**) pH inicial = 5,7

A análise de variância feita com a resposta EPS (g/L), incluindo o teste de falta de ajuste, e excluindo as interações x_1x_2 e x_2x_4 , que não foram significativas (com valores de p respectivamente 0,54 e 0,65), resultou nos dados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de variância da resposta EPS (g/L); R² ajustado = 0,8992

Fator	SQ	gl	QM	F	p
Bloco	0,0758	1	0,07577	2,578	0,249559
Curvatura	2,1236	1	2,12356	72,264	0,013557
Tempo de cultivo (x_1)	15,5709	1	15,57092	529,871	0,001882
Volume do inóculo padrão (x_2)	0,7251	1	0,72505	24,673	0,038221
Concentração de glucose (x_3)	67,5602	1	67,56018	2299,041	0,000435
Concentração de Tween 80 (x_4)	10,8768	1	10,87680	370,132	0,002691
1 x 3	1,3479	1	1,34792	45,869	0,021113
1 x 4	6,6075	1	6,60747	224,849	0,004418
2 x 3	2,3547	1	2,35469	80,129	0,012251
3 x 4	2,7027	1	2,70274	91,973	0,010699
Falta de ajuste	5,4568	7	0,77954	26,527	0,036801
Erro experimental	0,0588	2	0,02939		
Total	115,4606	19			

*Efeitos significativos destacados em negrito

Observa-se que embora o valor de R² ajustado tenha sido considerado aceitável, a falta de ajuste do modelo mostrou-se significativa ($p < 0,05$), possivelmente devido ao fato de a variância não ser homogênea. Pode ainda ser observado que o efeito bloco, atribuído a inoculações em momentos distintos, a partir de diferentes pré-inóculos, não foi significativo ($p = 0,25$), o que confirma a reprodutibilidade do método padronizado de inoculação através de suspensão de micélio homogeneizado.

Com o objetivo de estabilizar a variância e melhorar os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo, foi feita a transformação de Box-Cox da resposta EPS (g/L), utilizado o expoente ($\lambda = 0,5$) que foi indicado como significativo ($p < 0,01$). Portanto, as análises posteriores dos resultados do primeiro experimento de triagem de variáveis foram feitas com a resposta EPS (g/L) elevado ao expoente 0,5, ou seja a raiz quadrada do resultado da produção de EPS em cada experimento. Esses valores transformados estão na coluna EPS* da Tabela 9.

A análise de variância da resposta transformada EPS* está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Análise de variância dos valores transformados EPS*; R² ajustado = 0,9188

Fator	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Bloco	0,000212	1	0,000212	0,075	0,810201
Curvatura	0,021821	1	0,021821	7,707	0,108948
Tempo de cultivo (x_1)	1,286672	1	1,286672	454,466	0,002193
Volume do inóculo padrão (x_2)	0,009063	1	0,009063	3,201	0,215476
Concentração de glucose (x_3)	5,772318	1	5,772318	2038,843	0,000490
Concentração de Tween 80 (x_4)	0,770324	1	0,770324	272,086	0,003655
1 x 4	0,252369	1	0,252369	89,139	0,011033
2 x 3	0,206414	1	0,206414	72,908	0,013440
Falta de ajuste	0,404894	9	0,044988	15,890	0,060583
Erro experimental	0,005662	2	0,002831		
Total	8,729750	19			

*Efeitos significativos destacados em negrito

O efeito do tamanho do inóculo (variável x_2) não foi estatisticamente significativo ($p = 0,22$), conforme pode ser observado nas respostas obtidas nos experimentos 13 e 15 (Tabela 9), nos quais a variação do volume de suspensão de micélio de 1 a 7 mL não promoveu aumento expressivo da produção de EPS (2,97 e 3,04 g/L respectivamente), fixadas as demais variáveis nos mesmos níveis. O termo x_2 foi mantido no modelo devido à existência de significativa interação entre o tamanho do inóculo e a concentração de glucose no meio, representada pela interação binária x_2x_3 ($p < 0,05$).

O aumento do tempo de cultivo teve efeito negativo sobre a produção de EPS ($p < 0,01$), o que pode ser observado na Tabela 9, comparando-se as respostas dos pares de experimentos 1 e 2, e 9 e 10, nos quais a redução do tempo de cultivo de 168 para 72 horas proporcionou aumento na produção de EPS de cerca de 2 a 3 vezes, respectivamente.

A concentração de glucose foi expressivamente significativa ($p < 0,001$), podendo ser observada no par de experimentos 2 e 6, no qual um aumento de 10 para 50 g/L na concentração inicial de glucose promoveu aumento de cerca de 5 vezes (0,77 para 3,82 g/L) na produção de botriosferana.

A concentração inicial de Tween 80 também teve efeito significativo ($p < 0,001$), que pode ser observado na resposta obtida nos experimentos 1 e 9. Nesses pontos experimentais, um aumento de 1 para 5 g/L de Tween 80 proporcionou aumento de cerca de 100 % (de 1,53 para 3,01 g/L) na produção de botriosferana.

Neste modelo, que foi obtido com os valores da resposta transformada, o efeito bloco continuou sendo não significativo ($p = 0,81$), e da mesma forma a curvatura ($p = 0,11$), o que sugere não haver tendências a inflexão ou efeitos de ordem superior (quadrática) nessa região experimental, e dessa forma um modelo linear é suficiente para explicar a resposta. Foram incluídas somente as interações que se mostraram significativas. O modelo composto dessa forma ($p < 0,001$ para a regressão) apresentou resultado satisfatório para o coeficiente de determinação (R^2) ajustado (0,9188), e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), o que determina uma boa capacidade preditiva do modelo.

Os coeficientes de regressão obtidos pela análise de regressão múltipla, em termos de variáveis codificadas, e seus respectivos valores de erro-padrão estão representados na Equação 3. Os termos significativos ($p < 0,05$) estão representados em negrito.

$$\sqrt{\hat{y}} = \underset{\pm 0,04}{\mathbf{1,67}} - \underset{\pm 0,05}{\mathbf{0,28}x_1} + \underset{\pm 0,05}{0,02}x_2 + \underset{\pm 0,05}{\mathbf{0,61}x_3} + \underset{\pm 0,05}{\mathbf{0,22}x_4} - \underset{\pm 0,05}{\mathbf{0,13}x_1x_4} + \underset{\pm 0,05}{\mathbf{0,11}x_2x_3}$$

Eq. 3

O sinal negativo do coeficiente da interação binária x_1x_4 , que é uma consequência dos sinais opostos dos coeficientes dos termos lineares x_1 (tempo de cultivo) e x_4 (concentração de Tween 80), indica a existência de uma relação de proporcionalidade inversa entre esses dois efeitos. Segundo esse modelo, uma diminuição no tempo de cultivo deve ser acompanhada do uso de maior concentração de tensoativo, para se obter um aumento na produção de EPS. Da mesma forma, uma maior produção de botriosferana poderia ser obtida em maior tempo de cultivo, com o uso de menor quantidade de tensoativo, o que é consistente com os resultados apresentados no item 5.1.1, no qual havia sido estabelecido o melhor tempo de cultivo como sendo 144 horas, na ausência de Tween 80.

Outras variáveis potencialmente importantes no processo de produção de botriosferana por *B. rhodina* não foram contempladas neste experimento fatorial, como por exemplo a concentração de óleo vegetal. Stasinopoulos e Seviour (1990) estudaram o efeito de concentrações crescentes de óleo de oliva e óleo de girassol, no intervalo de 0 a 5 g/L, na produção de expolissacarídeo por *Acremonium persicinum*. West e Reed-Hamer (1995), em seus experimentos de produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023, não variaram a concentração de óleos vegetais, que ficou fixada em 2 g/L. Youssef e colaboradores (1998) estudaram o efeito da variação da concentração de óleo de oliva de 0 a

25 mL/L na produção de pululana por *A. pullulans*. Park e colaboradores (2002), em seus estudos de produção de biopolímeros extracelulares por *Cordyceps militaris*, variaram a concentração de óleos vegetais entre 0 e 50 mL/L.

O valor de pH inicial do meio de cultivo também é importante para a produção de botriosferana, conforme já foi observado nos resultados do item 5.1.5.

Objetivando-se estudar os efeitos da concentração de óleo de soja e suas interações com outras variáveis da fermentação, bem como a variação de pH em um intervalo semelhante aos valores utilizados nos relatos da literatura, para a produção de exopolissacarídeos por fungos na presença de óleos vegetais, o mesmo delineamento fatorial 2^4 em dois blocos foi novamente utilizado; e os resultados estão apresentados a seguir.

5.3.2 Segunda triagem de variáveis

A triagem de variáveis através de delineamento 2^4 em dois blocos, representando inóculos distintos, adicionado de dois pontos centrais por bloco (20 experimentos) foi desenvolvida utilizando-se a variável concentração de óleo, que não havia sido estudada na triagem anterior, bem como a variável pH inicial, em intervalo de variação consistente com as informações levantadas na literatura. As variáveis concentração de glucose e concentração de Tween 80 também foram incluídas neste delineamento, bem como os demais parâmetros de cultivo, fixados o tempo em 72 horas e o volume de inóculo 4 mL/100 mL de meio. Os resultados observados estão na Tabela 12.

Tabela 12 – Respostas obtidas no delineamento fatorial 2^4 em dois blocos, que avaliou os efeitos das variáveis pH inicial, concentração de óleo, concentração de glucose e concentração de Tween 80, no tempo de cultivo de 72 horas, utilizando 4 mL de inóculo padrão/100 mL de meio

Experimento	Ordem aleatória	Bloco	Variável				EPS (g/L)	Biomassa (g/L)	pH final
			x_1	x_2	x_3	x_4			
2	8	1	1	-1	-1	-1	0,37	5,23	3,48
3	5	1	-1	1	-1	-1	1,20	9,05	3,20
5	6	1	-1	-1	1	-1	0,23	2,74	2,99
8	3	1	1	1	1	-1	2,76	13,17	3,28
9	1	1	-1	-1	-1	1	0,38	4,64	3,02
12	9	1	1	1	-1	1	4,43	5,66	3,51
14	4	1	1	-1	1	1	1,14	8,63	3,28
15	7	1	-1	1	1	1	2,74	5,85	2,62
17 (C)	10	1	0	0	0	0	2,02	5,31	2,72
18 (C)	2	1	0	0	0	0	3,01	7,43	2,83
1	18	2	-1	-1	-1	-1	0,32	4,84	3,31
4	16	2	1	1	-1	-1	2,21	9,27	3,62
6	19	2	1	-1	1	-1	1,14	8,92	3,43
7	14	2	-1	1	1	-1	1,43	9,87	2,97
10	12	2	1	-1	-1	1	0,68	5,78	3,69
11	15	2	-1	1	-1	1	3,85	6,39	3,05
13	20	2	-1	-1	1	1	0,63	5,39	2,75
16	13	2	1	1	1	1	5,79	7,68	3,31
19 (C)	11	2	0	0	0	0	3,42	8,09	3,03
20 (C)	17	2	0	0	0	0	3,04	9,54	3,15

Fatores	Valores reais		
	-1	0	+1
x_1 , valor de pH inicial	4,3	5,0	5,7
x_2 , concentração de óleo (mL/L)	0	5	10
x_3 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50
x_4 , concentração de Tween 80 (g/L)	1	3	5

A análise de regressão múltipla permitiu obter um modelo estatisticamente significativo ($p < 0,001$), no qual não foram incluídos o efeito bloco e a curvatura, que se mostraram não significativos (com valores de p igual a 0,22 e 0,07 respectivamente). Foram incluídas no modelo somente as interações binárias significativas, ou aquelas cuja exclusão seria negativa para o coeficiente de determinação (R^2) ajustado. O teste de falta de ajuste ($p = 0,90$) mostrou que o modelo apresenta satisfatória capacidade preditiva, com R^2 ajustado igual

a 0,81 quanto a falta de ajuste, curvatura e erro experimental foram reunidos no resíduo. A análise de variância com o termo de erro decomposto nos três componentes estão na Tabela 13.

Tabela 13 – Análise de variância da resposta EPS g/L; R^2 ajustado = 0,95

Fator	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Bloco	0,89042	1	0,89042	3,21330	0,214910
Curvatura	3,47861	1	3,47861	12,55344	0,071251
Valor de pH inicial (x_1)	3,74229	1	3,74229	13,50498	0,066721
Concentração de óleo (x_2)	23,75588	1	23,75588	85,72894	0,011464
Concentração de glucose (x_3)	0,36482	1	0,36482	1,31653	0,369953
Concentração de Tween 80 (x_4)	6,22253	1	6,22253	22,45554	0,041763
1 x 2	1,10881	1	1,10881	4,00141	0,183455
1 x 3	0,92544	1	0,92544	3,33969	0,209148
2 x 4	4,44366	1	4,44366	16,03606	0,057073
Falta de ajuste	0,69674	8	0,08709	0,31429	0,903767
Erro experimental	0,55421	2	0,27710		
Total	46,18341	19			

*Efeitos significativos destacados em negrito

O efeito do pH inicial, que aparece como marginalmente significativo ($p = 0,067$) nesta análise, torna-se significativo ($p = 0,02$) na análise com os termos de erro reunidos no resíduo, o que é consistente com as observações dos pares de experimentos 5 e 6 (Tabela 13), no qual a diminuição do pH de 5,7 para 4,3 diminuiu em cerca de 80 % a produção de botriosferana (de 1,14 para 0,23 g/L). O valor do pH inicial tem, portanto, importante contribuição para a produção de botriosferana, e a diminuição do pH, a partir do valor normal característico do meio mínimo de Vogel (5,7) acarreta diminuição da produção deste EPS. Dessa forma, no experimento de otimização da produção utilizando metodologia de superfície de reposta (MSR), cujos resultados serão apresentados no item 5.3.3, foi mantido o pH inicial 5,7.

A concentração de óleo no meio de cultivo apresentou efeito significativo sobre a produção de botriosferana ($p < 0,001$ para o erro reunido no resíduo), podendo-se observar essa contribuição particularmente nos pares de experimentos 9-11 e 13-15 (Tabela 13), nos quais a adição de óleo até a concentração de 10 mL/L aumentou a produção de EPS de 0,38 para 3,85 g/L, e 0,63 a 2,74 g/L, representando um aumento de 10 e 4 vezes,

respectivamente. Esses resultados confirmam os obtidos nos experimentos apresentados nos itens 5.1.2 e 5.1.3, nos quais a presença de óleo aumentou significativamente a produção de botriosferana.

A concentração de glucose não se mostrou estatisticamente significativa ($p = 0,37$), em relação aos demais efeitos, nessa região experimental. No entanto, experimentos anteriores comprovaram que essa variável tem contribuição importante para a produção de EPS, por se tratar do próprio substrato sobre o qual atuam as enzimas envolvidas no processo de biossíntese da β -glucana.

Novamente, foi confirmada a significância do efeito da adição de Tween 80 ao meio de cultivo ($p < 0,01$ para o erro reunido no resíduo). Também pôde ser observada uma importante interação entre o óleo (x_2) e o tensoativo (x_4), na análise de variância com o erro composto ($p < 0,01$), o que reforça a teoria de que o tensoativo atua emulsificando o óleo, aumentando sua disponibilidade para o microrganismo.

Os coeficientes de regressão para o modelo ajustado obtido, em termos de variáveis codificadas, e seus respectivos valores de erro-padrão estão representados na Equação 4. Os termos significativos ($p < 0,05$) estão representados em negrito.

$$\hat{y} = \underset{\pm 0,15}{\mathbf{2,04}} + \underset{\pm 0,17}{\mathbf{0,48}}x_1 + \underset{\pm 0,17}{\mathbf{1,22}}x_2 + \underset{\pm 0,17}{0,15}x_3 + \underset{\pm 0,17}{\mathbf{0,62}}x_4 + \underset{\pm 0,17}{0,26}x_1x_2 + \underset{\pm 0,17}{0,24}x_1x_3 + \underset{\pm 0,17}{\mathbf{0,53}}x_2x_4$$

Eq. 4

O efeito do óleo na produção de botriosferana também pode ser observado nos coeficientes de regressão. Observa-se que o valor do coeficiente do óleo (x_2) é quase 10 vezes superior ao da glucose (x_3), o que novamente demonstra a importante contribuição do óleo de soja para o aumento da produção do EPS.

Não foi encontrada na literatura científica, até o momento, nenhuma publicação que relatasse o uso de planejamento fatorial para estudar a produção de exopolissacarídeos por fungos cultivados na presença de óleo. Este trabalho é o primeiro que utiliza a abordagem fatorial para avaliar os efeitos de tais variáveis de cultivo, entre elas a presença de óleo, adicionado ao meio de cultivo como adjuvante da produção da β -glucana. Outros trabalhos já demonstraram que óleos vegetais promovem aumento na produção de EPS microbianos. Stasinopoulos e Seviour (1990) cultivaram *Acremonium persicinum* na presença de óleo de oliva ou de girassol e obtiveram um aumento em torno de 77 % na produção de β -glucana, mesmo em concentrações baixas de óleo como 0,4 g/L. No cultivo de *Aureobasidium*

pullulans para a produção de pululana, West e Reed-Hamer (1995) observaram um aumento de 33 % na produção do EPS quando o meio de cultivo foi suplementado com 2 g/L de óleo de soja ou óleo de milho, e Youssef e colaboradores (1998) duplicaram a produção desse exopolissacarídeo em cultivos na presença de 25 mL/L de óleo de oliva.

5.3.3 Otimização da Produção de Botriosferana por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Os resultados obtidos nos experimentos de triagem de variáveis possibilitaram verificar a significância dos efeitos e escolher os intervalos de variação. Os fatores que se mostraram mais adequados à utilização em um delineamento de superfície de resposta foram estudados em três níveis. As variáveis selecionadas para a otimização por MSR foram concentração de glucose, concentração de óleo e concentração de Tween 80. As demais variáveis foram fixadas em tempo de cultivo 72 horas, 7 mL de inóculo padrão/100 mL de meio e pH inicial 5,7. Os resultados obtidos neste delineamento estão na Tabela 14, a seguir.

Tabela 14 – Resultados do delineamento Box-Behnken para 3 variáveis em 3 níveis, em tempo de cultivo 72 horas, utilizando 7 mL de inóculo padrão/100 mL de meio de cultivo e pH inicial 5,7

Experimento	Ordem aleatória	Variável			Respostas			
		x_1	x_2	x_3	EPS (g/L)	Micélio (g/L)	Glucose residual (g/L)	pH final
1	13	-1	-1	0	5,29	0,76	0,09	4,78
2	12	1	-1	0	10,65	2,05	21,98	4,10
3	5	-1	1	0	8,93	2,86	0,17	4,41
4	8	1	1	0	14,12	8,12	5,59	4,50
5	2	-1	0	-1	8,60	0,82	0,07	5,45
6	7	1	0	-1	13,29	1,41	15,77	3,56
7	3	-1	0	1	6,55	2,90	0,13	4,00
8	11	1	0	1	10,89	5,10	19,07	3,70
9	9	0	-1	-1	8,59	1,02	0,14	4,10
10	4	0	1	-1	15,17	1,56	0,16	4,39
11	10	0	-1	1	10,07	2,17	0,11	5,00
12	6	0	1	1	10,98	6,86	0,28	4,78
13 (C)	1	0	0	0	9,80	4,42	0,16	4,45
14 (C)	15	0	0	0	10,14	3,97	0,14	4,71
15 (C)	14	0	0	0	9,97	4,19	0,15	4,58

Fatores	Valores reais		
	-1	0	+1
x_1 , concentração de glucose (g/L)	10	30	50
x_2 , concentração de óleo (mL/L)	0	5	10
x_3 , concentração de Tween 80 (g/L)	0	2,5	5

A análise de variância (Tabela 15) permitiu criar um modelo quadrático significativo ($p < 0,002$) incluindo interações binárias. Como a falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p > 0,05$), os termos de erro foram reunidos no resíduo, e dessa forma, o modelo apresentou coeficiente de determinação (R^2) ajustado de 0,89, e quadrado médio do resíduo de 0,53. A boa capacidade preditiva do modelo também está demonstrada no diagrama de valores previstos *versus* valores observados (Fig. 6), no qual se pode observar um boa correlação entre esses dois conjuntos de valores.

Tabela 15 – Análise de variância da resposta EPS (g/L); R^2 ajustado = 0,89

Fator	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Concentração de glucose (x_1) L	10,91613	1	10,91613	20,76639	0,003863
Concentração de glucose (x_1) Q	1,04759	1	1,04759	1,99289	0,207736
Concentração de óleo (x_2)	22,47516	1	22,47516	42,75580	0,000611
Concentração de Tween 80 (x_3) L	18,70273	1	18,70273	35,57929	0,000995
Concentração de Tween 80 (x_3) Q	4,32294	1	4,32294	8,22377	0,028512
1 x 2	3,94618	1	3,94618	7,50705	0,033740
1 x 3	0,64803	1	0,64803	1,23278	0,309372
2 x 3	4,30978	1	4,30978	8,19874	0,028676
Resíduo	3,15398	6	0,52566		
Total	69,24448	14			

*Efeitos significativos destacados em negrito

A significância dos efeitos dessas variáveis, demonstrada nos delineamentos anteriores foi novamente confirmada por esses resultados. O efeito quadrático do óleo (x_2) não foi incluído no modelo porque não foi significativo ($p = 0,64$), e o efeito quadrático da glucose (x_1), embora não tenha sido significativo ($p = 0,21$) foi mantido para preservar o valor de R^2 ajustado.

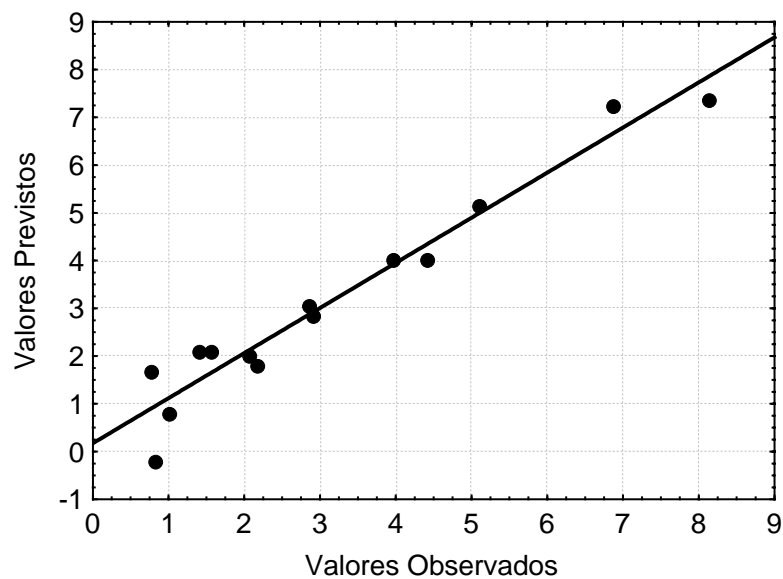


Figura 6 – Valores previstos *versus* valores observados para o modelo ajustado. R^2 ajustado = 0,89; QM Resíduo = 0,53

Os coeficientes de regressão, em termos das variáveis codificadas, e seus respectivos valores de erro-padrão estão representados na Equação 5. Os termos significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

$$\hat{y} = \mathbf{4,07} + \mathbf{1,17}x_1 - 0,53x_1^2 + \mathbf{1,68}x_2 + \mathbf{1,53}x_3 - \mathbf{1,08}x_3^2 + \mathbf{0,99}x_1x_2 + 0,40x_1x_3 + \mathbf{1,04}x_2x_3$$

$\pm 0,35$ $\pm 0,26$ $\pm 0,38$ $\pm 0,26$ $\pm 0,26$ $\pm 0,38$ $\pm 0,36$ $\pm 0,36$ $\pm 0,36$

Eq. 5

Os diferentes efeitos das variáveis de entrada na produção de botriosferana também podem ser observados nos diagramas de superfície de resposta (Figura 7). Com base no modelo ajustado obtido foi feita a previsão da condição ótima pela função de desejabilidade de Derringer e Suich (STATSOFT, 1997). Esse método permitiu prever uma produção ótima de EPS de $8,22 \pm 1,36$ g/L, quando do cultivo do microrganismo na presença de 40 g/L de glucose, 10 mL/L de óleo de soja e 4,5 g/L de Tween 80.

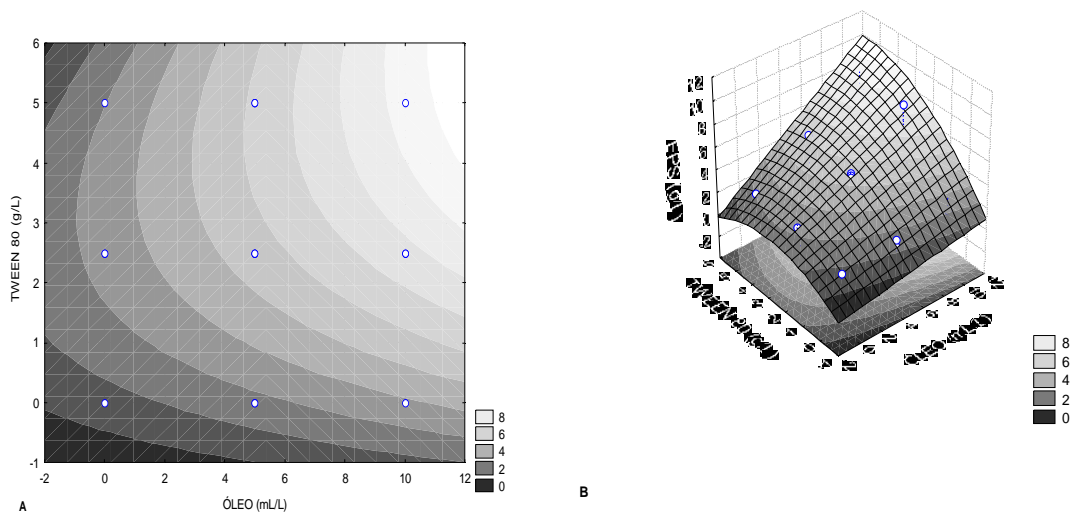


Figura 7 – Superfície ajustada para a variável dependente EPS (g/L). Glucose (x_1) = 40 g/L; R^2 ajustado = 0,89; QM Resíduo = 0,53. A) Curva de Nível B) Diagrama tridimensional

Na validação experimental, o microrganismo foi cultivado nas condições ótimas previstas acima, e o resultado de produção de botriosferana foi de $7,74 \pm 0,13$ g/L, concordante com o intervalo de confiança do resultado previsto pelo modelo.

Observa-se uma tendência ao aumento da produção de EPS no sentido do aumento da concentração de óleo de soja, bem como de Tween 80. No entanto, a região

experimental ficou limitada a 10 mL/L de óleo, devido aos problemas de ordem técnica anteriormente mencionados, como dificuldade na separação do EPS e extração do produto, o que impediu o uso de concentrações de óleo superiores às que foram empregadas. Não obstante, tais dificuldades não são mencionadas nos artigos constantes da literatura.

Outros autores já estudaram os efeitos de diferentes concentrações de óleos vegetais no cultivo de fungos para a produção de exopolissacarídeos. Stasinopoulos e Seviour (1990) observaram um aumento de 13 para 23 g/L na produção de EPS por *Acremonium persicinum* cultivado na presença de 0,4 g/L óleo de oliva ou de girassol, seguido de um posterior aumento até 28 g/L na produção de β -glucana, com o aumento da concentração de óleo até o limite de 5 g/L. Youssef e colaboradores (1998), que estudaram a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans*, não observaram aumento significativo na produção do exopolissacarídeo, que se manteve próximo de 34 g/L, quando a concentração de óleo de oliva foi aumentada de 10 para 20 mL/L, na presença de 80 g/L de sacarose como fonte de carbono. Park e colaboradores (2002) estudaram os efeitos da adição de óleos vegetais em concentrações no intervalo de 0 a 50 mL/L, na produção de biopolímeros extracelulares por *Cordyceps militaris*; observaram que a melhor resposta na produção de biopolímeros (cerca de 7 g/L) pôde ser obtida na presença de 20 mL/L dos óleos de girassol ou de oliva.

5.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BOTRIOSFERANA PRODUZIDA NA CONDIÇÃO OTIMIZADA NA PRESENÇA DE ÓLEO DE SOJA E TWEEN 80

Com o objetivo de caracterizar parcialmente o polissacarídeo produzido na presença de óleo e Tween 80, para comprovar a presença da β -glucana, foram realizados experimentos que permitiram avaliar o perfil de distribuição de massa molar das cadeias do polissacarídeo, o tipo de ligação glicosídica, bem como os seus monômeros constituintes.

O perfil de eluição do EPS em gel (Figura 8) apresentou somente um pico, o que caracteriza a presença um polissacarídeo constituído de uma população de moléculas polidispersas. Esse resultado foi semelhante ao observado por Youssef e colaboradores (1998), em um estudo de produção de pululana na presença de óleo de oliva por *Aureobasidium pululans*, no qual também comprovaram que a adição do óleo ao meio de cultivo não afetou a distribuição de massa molar do EPS.

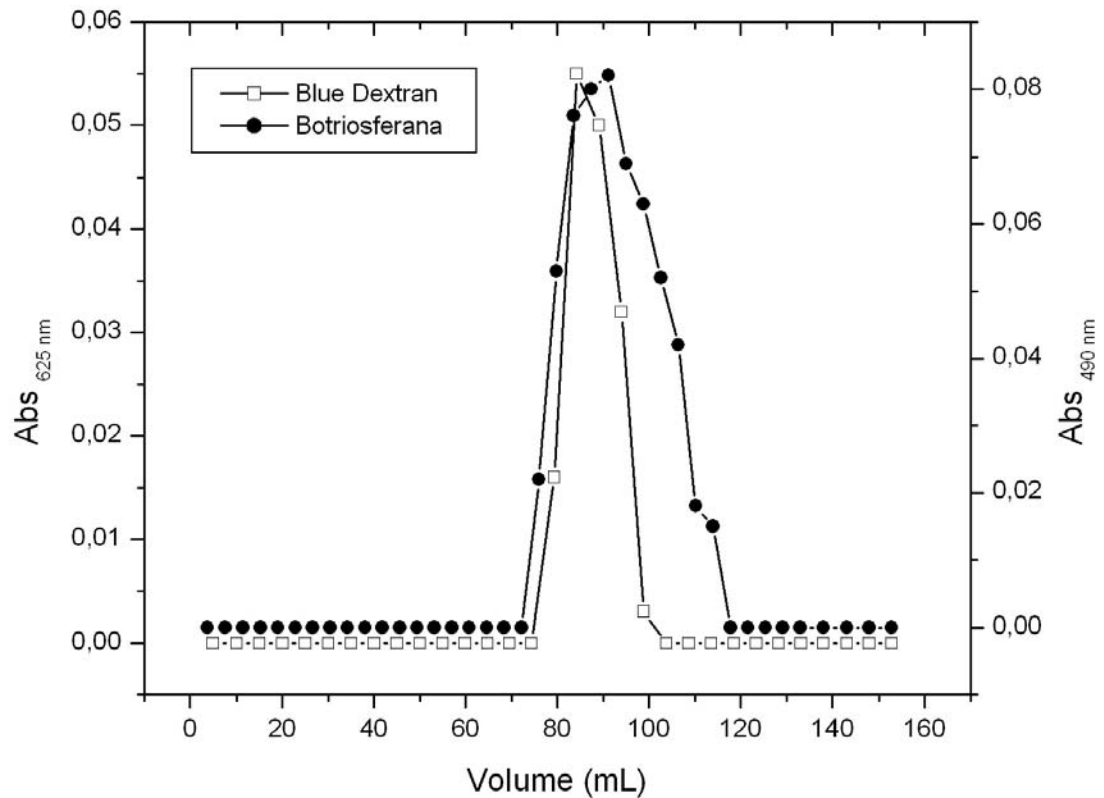


Figura 8 – Perfil de eluição da botriosferana produzida na condição otimizada na presença de óleo de soja e Tween 80, em Sepharose CL 4B utilizando água destilada como fase móvel.

A Figura 9 mostra o cromatograma da análise por HPAEC, dos produtos da hidrólise ácida da botriosferana produzida nas condições otimizadas.

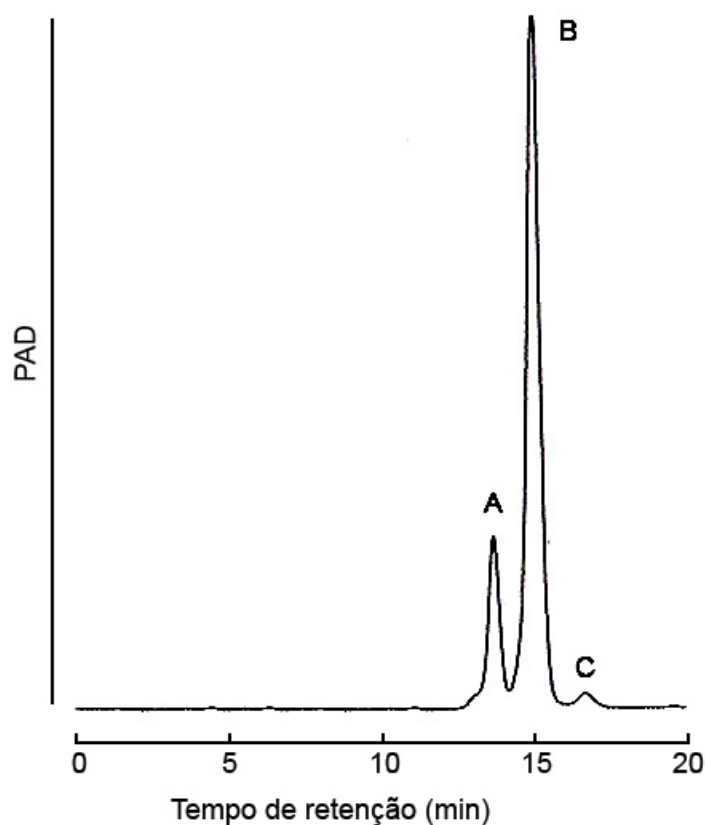


Figura 9 – Análise por HPAEC dos produtos de hidrólise da botriosferana produzida na condição otimizada. Os picos representam A) galactose, B) glucose e C) manose

No cromatograma (Figura 9) pode-se observar que a botriosferana é constituída de glucose (pico B), devido à presença majoritária deste monossacarídeo, havendo ainda, em menores quantidades, galactose e manose (picos A e C respectivamente), cuja presença pode ser devida a glicoproteínas extracelulares que precipitaram concomitantemente com o EPS, visto que 2 % de proteínas foi detectada no material.

A confirmação da presença de ligações β -glicosídicas na botriosferana produzida na condição otimizada pode ser observada na Figura 10, que mostra o espectro de FTIR.

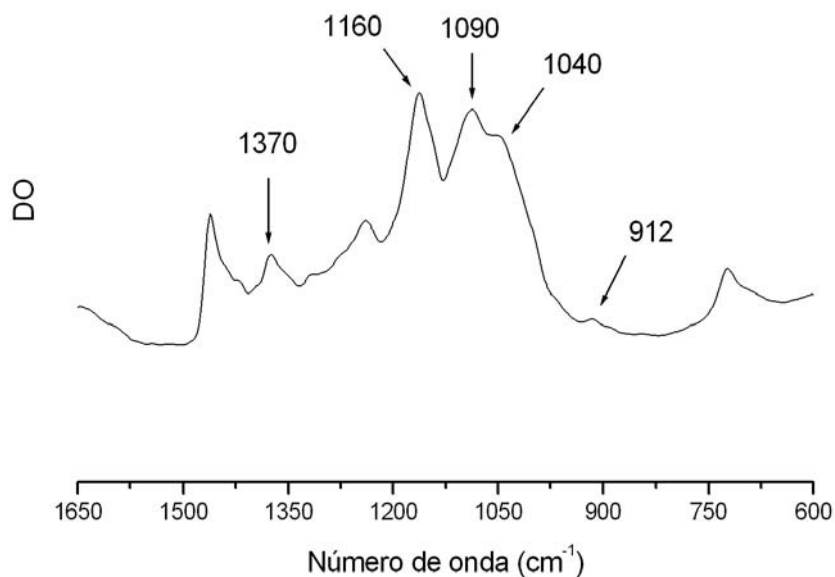


Figura 10 – Espectro FTIR da botriosferana produzida na condição otimizada.

Neste espectrograma (Figura 10) pode-se observar o pico em 912 cm^{-1} que indica a presença da ligação glicosídica tipo β . O pico em 1370 cm^{-1} é característico de β -glucanas, enquanto que os picos identificados em 1160 , 1090 e 1040 cm^{-1} são devidos à presença de resíduos de glucose 1,3-di-*O*-substituídos. Esses resultados demonstram que o produto analisado é uma β -glucana, provavelmente 1 \rightarrow 3, e que não houve alteração estrutural do polímero.

O EPS produzido na condição otimizada apresentou aproximadamente 18 % de açúcares totais e 2 % de proteínas. O restante da composição química será tema da continuação deste trabalho, assim como suas propriedades reológicas e biológicas, visto que um novo tipo de polímero com composição e propriedades peculiares pode ter sido obtido na presença de óleo e Tween 80.

6 CONCLUSÕES

- a) A adição de óleo vegetal aumentou a produção de botriosferana, enquanto que a de etanol não promoveu diferença significativa na produção;
- b) A procedência do óleo comercial interferiu na produção de botriosferana, ainda que de uma mesma fonte vegetal (soja). Entretanto, o conservante TBHQ utilizado em alguns óleos de soja, não afetou a produção deste EPS;
- c) A adição do tensoativo Tween 80 aumentou em 68 % a produção de botriosferana, enquanto que a adição deste tensoativo mais o óleo de soja dobrou a sua produção;
- d) O Tween 80 isoladamente não afetou a produção de biomassa fúngica de *B. rhodina*, porém a adição do óleo de soja juntamente com o tensoativo proporcionou um aumento de 23 % na produção de biomassa;
- e) Valores de pH inicial na faixa de 4 a 5 diminuíram a produção de botriosferana;
- f) O tempo de cultivo, pH inicial, as concentrações de glucose, óleo de soja e de Tween 80 foram as variáveis que tiveram efeito significativo na produção de botriosferana;
- g) A condição otimizada para a produção de botriosferana foi: glucose 40 g/L, óleo de soja 10 mL/L, Tween 80 4,5 g/L, durante 72 horas, a 180 rpm, 28 °C, pH inicial 5,7, com 7 mL de inóculo padrão para cada 100 mL de meio de cultivo, na condição padrão estabelecida;
- h) A produção de botriosferana prevista pelo modelo matemático foi $8,22 \pm 1,36$ g/L, enquanto que a produção obtida na validação experimental foi $7,74 \pm 0,13$ g/L, confirmando o resultado previsto;
- i) A adição de óleo de soja e de Tween 80 não afeta a estrutura da botriosferana produzida na condição otimizada, considerando-se a caracterização parcial da sua estrutura química.

REFERÊNCIAS

- ANGELOVA, B.; SCHMAUDER, H-P. Lipophilic compounds in biotechnology: interactions with cell and technological problems. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.67, p.13-32, 1999.
- BAE, J. T.; PARK J. P.; SONG, C. H.; YU, C. B.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Effect of the carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka v.91, n.5, p.522-524, 2001.
- BAE, J. T.; SINHA, J.; PARK, J.-P.; SONG, C.-H.; YUN, J.-W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, Kangnam-Ku, v.10, n.4, p.482-487, 2000.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p.29-42, 2004.
- BARBOSA, A. M.; STELUTTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by the ascomycetous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research.**, Amsterdam, v.338, p.1691-1698, 2003.
- 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 dy Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. In vivo decolourization of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. In: PACIFIC RIM BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, 4th, 1995, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne, Australia, 1995. p.88-90.
- BOX, E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J. (Ed.). **The merck index: an encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 13.ed. Rahway: Merck & Co., 2001.

CORRADI DA SILVA, M. L.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, G. V. J. Purification and structural characterisation of (1 → 3;1 → 6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources : a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Barking v.61, n.1, p.10-17, 2005.

COVIELLO, T.; PALLESCHI, A.; GRASSI, M.; MATRICARDI, P.; BOCCHINFUSO, G.; ALHAIQUE, F. Scleroglucan: a versatile polysaccharide for modified drug delivery. **Molecules**. v.10, p.6-33, 2005.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; SUMIYA, A. F. G.; FONSECA, E. A. I.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Optimisation of some parameters using statistical methodologies for botryosphaeran production by *Botryosphaeria rhodina*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2005. PFI-311.

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

DOUGLAS, C. M. Fungal □(1,3)-D-glucan synthesis. **Medical Mycology**, Oxford, v.39, n.1, p.55-66, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, T. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUENAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 113-120, 2003.

EL-DEIN, M. M. N.; EL-FALLAL, A. A.; EL-SHAHAT, A. T.; FATEN, E. H. Exopolysaccharide production by *Pleurotus pulmonarius*: factors affecting formation and their structures. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, n.6, p.1078-1084, 2004.

FARIÑA, J. I.; SIÑERIZ, F.; MOLINA, O. E.; PEROTTI, N. I. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii*. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.44, p.41-50, 2001.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.26, n.4, p.463-470, 2004.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1994.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2005.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Biomedical applications of functional biopolymers. **Reactive and Functional Polymers**, v.39, p.99-138, 1999.

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

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; SUNG, J. M.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, p.120-126, 2003a.

KIM, S. W.; XU, C. P.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; KIM, C. W.; YUN, J. W. Production and Characterization of Exopolysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. **Biotechnol. Prog.**, Washington, v.19, p.428-435, 2003b.

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**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 419-426, 2002.

MIRANDA, C. C B. O. **Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocloesterolêmica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Updates.** v.7, p.301-309, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 4.ed. New York: W. H. Freeman, 2004.

PARK, J.-P.; KIM, S.-W.; HWANG, H.-J.; CHO, Y.-J.; YUN, J.-W. Stimulatory effects of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.31, p.250-255, 2002a.

PARK, J. P.; KIM, Y. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHO, Y. J.; LEE, Y. S.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, Kidlington, v.37, p.1257-1262, 2002b.

PARK, J. P.; KIM, S. W.; HWANG, J.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, p.76-81, 2001.

PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. **Microbial technology.** 2.ed. New York: Academic Press, 1979. v.1

RICCIARDI, A.; PARENTE, E.; CRUDELE, M. A.; ZANETTI, F.; SCOLARI, G.; MANNAZZU, I. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 297-306, 2002.

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

SELITRENNIKOFF, C. P. **Antifungal Drugs: (1,3) β -glucan Synthase Inhibitors.** Austin: R. G. Landes Company, 1995.

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**, Boca Raton, v.12, n.3, p.279-298, 1992.

SLAMEŇOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIŽKOVÁ, L.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, Shannon, v.198, p.153-160, 2003.

STASINOPOULOS, S. J.; SEVIOUR, R. J. Stimulation of Exopolysaccharide Production in the Fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.36, p.778-782, 1990.

STATSOFT. **Statistica 5.1**. Tulsa: Statsoft, 1997.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomycetous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v.44, n.6, p.480-486, 2004.

SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Production of scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156. **Bioresource Technology**, Kidlington, v.87, n.8, p.989-993, 2006.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Kidlington, v.11, p.663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **TIBTECH**. v.16, p.42-46, 1998.

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**, New York, v.32, p.478-484, 2003.

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**, London, v.35, p.1131-1138, 2000.

VOGEL, H. J. A. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.60, p.258-274, 2002.

WEST, T. P.; REED-HAMER, B. Effect of oils and surfactants on pullulan production relative to nitrogen source. **Microbios**, Cambridge, v.83, p.249-259, 1995.

XU, C. P.; YUN, J. W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p.33-39, 2004.

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**, New York, v.27, p.295-301, 2000.

YANG, F.-C.; HWANG, S.-Y. Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Tunghai Journal**, v.39, p.1-10, 1998.

YOUSSEF, F.; BILIADERIS, C. G.; ROUKAS, T. Enhancement of Pullulan Production by *Auerobasidium pullulans* in Batch Culture Using Olive Oil and Sucrose as Carbon Sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.74, p.13-30, 1998.

ZHANG, W.; YANG, J.; CHEN, J.; HOU, Y.; HAN, X. Immunomodulatory and antitumor effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumor-bearing mice. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.42, p.9-15, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo científico: “Effects of soybean oil and Tween 80 on production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*”

Effects of soybean oil and Tween 80 on production of botryosphaeran by

Botryosphaeria rhodina

Cassiano C. Silva¹, Robert F. H. Dekker^{1#}, Rui Sérgio S. F. Silva²,

Maria de Lourdes Corradi da Silva³ and Aneli M. Barbosa^{1*}

¹*Deptº. de Bioquímica e Biotecnologia – CCE; Universidade Estadual de Londrina, Cx.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil*

²*Deptº. de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CCA, Universidade Estadual de Londrina, Cx.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil*

³*Deptº de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, CEP 19060-900, Presidente Prudente, SP, Brazil*

[#]*Present address: Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, 13071 Ciudad Real, España*

Abbreviated running title: **Production of Botryosphaeran**

* Corresponding author: Dr. Aneli M. Barbosa. *E-mail:* aneli@uel.br

Abstract

The addition of soybean oil and Tween 80 was evaluated with the objective of increasing the production of botryosphaeran, an exopolysaccharide (EPS) of the (1→3);1→6)-β-D-glucan type produced by the fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Factorial design and analysis by response surface methodology was developed to select the main factors that would affect and enhance EPS production. The optimized culture conditions were: 40 g l⁻¹ glucose with 10 ml l⁻¹ soybean oil, and 4.5 ml l⁻¹ Tween 80, during 72 h cultivation at 28 °C (180 rpm) and initial pH 5.7. The predicted result for botryosphaeran production was 8.22 ± 1.36 g l⁻¹, and that for the observed was 7.74 ± 0.13 g l⁻¹. The partial characterization of botryosphaeran produced under the optimized conditions showed one type of polysaccharide with β-glycosidic linkages containing mainly glucose as monosaccharide.

Keywords: Botryosphaeran; Botryosphaeria rhodina MAMB-05; *Exopolysaccharide; Soybean oil; Tween 80; Response surface methodology*

1 INTRODUCTION

Exopolysaccharides are carbohydrate polymers that are synthesized by some fungi and bacteria [1]. These polysaccharides have important industrial applications such as emulsifying and foam stabilizing agents, food coatings and thickening agents [2]; as modified drug delivery systems and other applications based upon their technological properties [3]. The β -glucans, a class of glucose polymers known to have biological response modification properties, have anti-tumor and immunomodulating activities as described in scientific literature [4].

Different microorganisms are able to produce β -glucans, including bacteria of the genus *Agrobacterium* and *Rhizobium*, which produce curdlan, a neutral gel-forming 1,3- β -D-glucan synthesized in the stationary phase of growth after total consumption of nitrogen. Another group of β -glucans are the scleroglucans, produced by several fungal species notably *Sclerotium glaucanicum* and *S. rolfsii*, and *Schizophyllum commune*. These exopolysaccharides have the common structure of a β -1,3-linked D-glucose backbone chain, containing β -1,6-D-glucosyl branches attached at varying degrees of frequency, which can affect their solubility [2].

Botryosphaeria rhodina is an ascomycetous fungus recently described as a producer of a β -glucan [5], that was later characterized as a β -1,3-D-glucan with approximately 22 % of β -1,6 branches comprising glucosyl and gentiobiosyl residues, and named botryosphaeran [6]. Botryosphaeran can be produced on several carbohydrate carbon sources, including glucose, fructose, mannose, sucrose and sugar cane molasses [7]. However, the carbon source can affect the degree of branching, which was found to be 31 % when the fungus was grown on fructose, and 21 % when grown on sucrose and glucose [8].

Production of exopolysaccharides can be enhanced by the addition of vegetable seed oils, fatty acids and surfactants to the fermentation media. This was first described in cultures of the fungus *Acremonium persicinum* for production of a β -glucan, to which olive oil or sunflower oil were added at concentrations up to 5 g l⁻¹. The authors observed a 2-fold increment in exopolysaccharide yields even at the lowest levels supplied (0.4 g l⁻¹) [9]. Other reports on vegetable

oils and fatty acids in EPS production described the enhanced production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* using olive oil and soybean oil [10, 11]. However, some oils and fatty acids also inhibited the biosynthesis of EPS, and the extent of these effects was related to the type of fatty acids. In *Ganoderma lucidum*, a basidiomycete used in traditional Chinese medicine and a producer of a β -1,3-D-glucan, palmitic acid greatly enhanced the yields, whereas linolenic acid was a strong inhibitor of both EPS production and mycelial growth [12]. The surfactant Tween 80, polyoxyethylene sorbitan mono-oleate, was also shown to stimulate pullulan production by *A. pullulans*, and depending upon the nitrogen source used in the fermentation medium, the addition of Tween 80 was able increase the production of the EPS by some 3-fold [10]. This stimulation of EPS production or its release into the extracellular medium could be related to an interaction between the fatty acyl chains and the fungal cell membrane phospholipids [13].

Beta-glucans such as botryosphaeran have important industrial and medical applications, and further investigation into their physical and biological properties are in progress in our lab. However, their inclusion as new materials in production scale requires the use of effective strategies to increase the yields of these polysaccharides in fermentation processes. Considering that edible vegetable seed oils are readily available and are capable of enhancing EPS production, the objective of this work was to use factorial planning and response surface methodology to evaluate the effects and optimise culture parameters of *B. rhodina* MAMB-05 for the production of botryosphaeran in submerged cultures grown in the combined presence of soybean oil and Tween 80.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. *Microorganism and cultivation*

Botryosphaeria rhodina (formerly described as *Botryosphaeria* sp., isolate MAMB-5 [14]) was maintained on potato-dextrose agar (PDA) at 4 °C. The pre-inocula and inocula and also submerged cultures were developed according to the protocol of Barbosa et al. [6]. Seven ml of standardised optical density mycelium suspension was inoculated into 100 ml Erlenmeyer flasks

containing Vogel minimum salts medium (VMSM), and variable concentrations of glucose (10 to 50 g l⁻¹), soybean oil (0 to 10 ml l⁻¹) and Tween 80 (0 to 5 g l⁻¹), according to the experimental design shown in Table 1, and incubated at 28 °C (180 rpm) for 72 h.

2.2. *Extraction and determination of botryosphaeran*

Cultures were centrifuged at 7150 × g for 25 min at 15 °C. The extracellular fluid (ECF) was separated and the mycelial biomass of each culture suspended in 100 ml of distilled water and centrifuged again (same speed) for 15 min. The recovered mycelium was determined gravimetrically. Residual glucose and pH were determined in the ECF. The ECF was then pooled with the water-wash from the mycelium, treated with three volumes of absolute ethanol and allowed to stand overnight at 4 °C for precipitation of botryosphaeran. The botryosphaeran precipitate was solubilised in distilled water, exhaustively dialysed against deionised water with frequent changes of water, and then freeze-dried.

2.3. *Factorial design and analysis*

Conditions for the optimisation of botryosphaeran production by *B. rhodina* MAMB-05 by controlling fermentation variables were performed using a factorial design and analysis by the response surface method. A factorial 3-level (-1; 0; +1) Box-Behnken design [15] with three replicates at the central-point summarizing 15 experimental runs (Table 1) was used to optimise the conditions of soybean oil, Tween 80 and glucose concentration for EPS production. The coded variables were $x_1 = [\text{glucose} - 30] / 20$, $x_2 = [\text{soybean oil} - 5] / 5$, and $x_3 = [\text{Tween 80} - 2.5] / 2.5$. The factors and respective levels of variation are shown in Table 1. Analysis of variance (ANOVA) and multiple regression analysis were performed at the level of 5 % significance using the statistical package STATISTICA Version 5.1 (www.statsoft.com StatSoft Inc.).

2.4. Analytical techniques

Glucose was determined by glucose oxidase method using a Glucose Bioliquid Reagent Kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Total sugars were measured by the phenol-sulfuric acid method of Dubois et al. [16].

Fungal biomass and botryosphaeran were determined gravimetrically by drying to constant weight at 70 °C. Protein was determined by a modified Lowry procedure [17] using bovine serum albumin as standard.

FT-IR spectroscopy was performed using a Bruker Vector 22 Model FT-IR Spectrometer with freeze-dried botryosphaeran produced under optimized conditions (1 mg of total sugar) in a KBr (300 mg) disc. Scan was conducted in the 1650 - 600 cm^{-1} range at a resolution of 2 cm^{-1} .

2.5. Gel permeation chromatography

Botryosphaeran produced under optimal conditions was repeatedly precipitated with absolute ethanol and solubilised in distilled water. After evaporating the residual ethanol the sample (1 mg) was dissolved in water (2.5 ml), applied to the gel permeation column (Sephacryl CL 4B; 2.5 cm x 46.0 cm) and eluted with water at 1.2 ml min^{-1} . Fractions (3.8 ml) were analyzed for total sugars.

2.6. Monosaccharide analysis

Monosaccharides were determined by total acid hydrolysis using 5 M trifluoroacetic acid (TFA) at 100 °C for 16 h. TFA was evaporated and the residues dissolved in 1.0 ml of deionised water, and evaporated again. This procedure was repeated several times. The hydrolysis product was solubilised in deionised water for monosaccharide analysis by high performance anionic exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). Twenty-five μl -samples were injected into a CarboPac PA1 column coupled to an Aminotrap pre-column (Dionex), and eluted with 14 mM NaOH at room temperature. Identification of monosaccharides was performed by comparison of peaks with retention times from standard monosaccharides.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Stasinopoulos and Servior [9] showed that adding sunflower oil (0.12 g l^{-1}) to the culture medium enhanced the production of a β -glucan by *A. persicinum*. Likewise, Yang et al. observed that palmitic acid enhanced (40 %) a β -glucan produced by *G. lucidum* [12]. Some previous experiments with *B. rhodina* MAMB-05 demonstrated that different commercial soybean oils as well as babassu oil (10 ml l^{-1}) increased botryosphaeran production by up to 63 % (unpublished data). Moreover, there was no significant difference amongst the oils examined, regardless of the presence of *tert*-butylhydroxyquinone (TBHQ), a preservative added to some edible seed oils as an antioxidant (data not shown).

West and Reed-Hammer [10] demonstrated that Tween 80 (2 g l^{-1}) enhanced pullulan production by *A. pullulans* ATCC 42023 some 3.0-fold using ammonium sulphate as the nitrogen source. However, when the nitrogen source was replaced by corn steep liquor, Tween 80 decreased EPS production. Youssef et al. [11] showed that Tween 80 (5 g l^{-1}) plus olive oil (25 ml l^{-1}) doubled pullulan production by *A. pullulans*. For *B. rhodina* the addition of Tween 80 (2 g l^{-1}) enhanced botryosphaeran production by 68 % and had no effect on fungal biomass production. However, soybean oil plus Tween 80 increased two-fold the production of botryosphaeran and 1.2-fold fungal biomass (data not presented).

Factor screening experiments at 2 levels were performed prior to the main experimental design studied in this work. This allowed establishing some culture parameters that were most favourable for botryosphaeran production: initial pH, 5.7; growth time, 72 h; and volume of standard inoculum volume, 7 ml. These experiments also demonstrated that the most significant factors to enhance botryosphaeran production were glucose, soybean oil, and Tween 80 concentrations (data not shown).

The 3-level Box-Behnken design yielded the results shown in Table 1. The highest production of botryosphaeran (8.12 g l^{-1} , run #4) occurred in the presence of high levels of both glucose (50 g l^{-1}) and soybean oil (10 ml l^{-1}). However, under these conditions there was a significant amount of residual glucose (5.59 g l^{-1}) not consumed by the fungus. Experimental run #12 yielded the second highest value for botryosphaeran production (6.86 g l^{-1}), and only a low amount of residual glucose could be detected, when glucose was added at the concentration of 30 g l^{-1} . These observations were taken into

account when near-optimal conditions were established that did not leave significant levels of residual glucose in the culture fluid following growth.

The analysis of variance of the response EPS production (g l^{-1}), fitted in a second-order model with significant regression ($p < 0.002$), indicated that all factors and some binary interactions had significant effects (data now shown). There was no significant lack-of-fit ($p > 0.05$), and the adjusted R^2 value was 0.8937.

The polynomial equation that represents the second-order model used to explain the response EPS (\hat{y} , g l^{-1}) is given below:

$$\hat{y} = \underset{\pm 0.35}{\mathbf{4.07}} + \underset{\pm 0.26}{\mathbf{1.17}}x_1 - \underset{\pm 0.38}{0.53}x_1^2 + \underset{\pm 0.26}{\mathbf{1.68}}x_2 + \underset{\pm 0.26}{\mathbf{1.53}}x_3 - \underset{\pm 0.38}{\mathbf{1.08}}x_3^2 + \underset{\pm 0.36}{\mathbf{0.99}}x_1x_2 + \underset{\pm 0.36}{0.40}x_1x_3 + \underset{\pm 0.36}{\mathbf{1.04}}x_2x_3$$

The model features significant effects and binary interactions (represented in bold typeface), except for the quadratic effect of soybean oil concentration, which was excluded, as it was not significant.

The coefficients included in the model showed that an increment in glucose concentration, and the addition of both soybean oil and Tween 80 (starting from level -1 : no oil or Tween added) led to an increased production of botryosphaeran. These data are in agreement with observations reported by Youssef et al. [11], who demonstrated that the addition of Tween 80 led to an increased production of pullulan by *A. pullulans*. Moreover, the effect of a vegetable seed oil added to the culture media for production of exopolysaccharide, as described in this work, has likewise been observed in earlier reports [9, 10, 18]. The significance of effects also proved the importance of the interaction between oil (x_2) and Tween 80 (x_3) concentrations, which suggests the contribution of the surfactant in formation of an emulsion, thus enhancing the availability of the soybean oil to the fungus.

A near-optimal condition was predicted using the desirability function, and the parameters were established as follows: 40 g l^{-1} glucose, 10 ml l^{-1} soybean oil and 4.5 g l^{-1} Tween 80. Although the coefficients of the model showed a marked positive effect of glucose concentration, the results of residual glucose determinations (Table 1) showed that a significant amount of carbon source was left unconsumed when the fungus was grown for 72 h in the presence of higher levels of glucose (50 g l^{-1} ; runs # 2, 4, 6 and 8). Therefore the value of 40 g l^{-1} glucose was chosen for this variable. The effects represented in the model were used to plot the fitted response surface for production of botryosphaeran

(Figure 1). Despite the visible tendency for an increase in botryosphaeran production with increasing soybean oil concentrations greater than 10 ml l^{-1} , cultures grown in the presence of such high soybean oil concentrations became excessively viscous, and could not be harvested by means of the methods available; therefore no botryosphaeran could be extracted from these cultures. Likewise, a tendency for increasing the response with an increase of Tween 80 could be observed. However, concentrations of surfactants added to microbial cultures are limited by their cost, hence a concentration of Tween 80 within the range studied here was established for the production of botryosphaeran.

Experimental validation of the model was performed under the conditions established (40 g l^{-1} glucose, 10 ml l^{-1} soybean oil and 4.5 g l^{-1} Tween 80), and the predicted result was $8.22 \pm 1.36 \text{ g l}^{-1}$ (95 % confidence interval). The observed production of botryosphaeran under these conditions was $7.74 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$, which is within the confidence interval and thus consistent with the predicted values.

FT-IR spectrum analysis (Figure 2) allowed the determination of the types of linkages and a comparison between the botryosphaerans produced in the absence [7] and combined presence of Tween 80 and soybean oil. Spectral bands at 912 and 1370 cm^{-1} were characteristic of glucans with β -glycosidic linkages, and those at 1160 , 1090 and 1040 cm^{-1} were due to the presence of (1,3)-di-O-substituted glucose residues. These results showed no difference between the products, or between the EPS produced in this work and other botryosphaerans previously studied [7].

Gel permeation chromatography yielded a single peak, thus providing evidence that the polysaccharide obtained under the conditions studied consisted of a single polymer population (Figure 3).

HPAEC analysis of the monosaccharides released on total acid hydrolysis of botryosphaeran yielded the data shown in Figure 4. The retention times of the peaks observed in the sample were compared to those of a standard neutral monosaccharide mixture. The peak observed at 15.10 min (B) corresponded to that of glucose, as botryosphaeran is an exopolysaccharide comprised of glucose monomers. Two other peaks were also observed (retention times 13.76 and 16.78 min) and comparison with the standard mixture indicated respectively, galactose (A) and mannose (C), and confirmed by co-injection. Both galactose and mannose occurred in relatively small amounts in the

sample of botryosphaeran used in these analyses, and probably arise from glycoproteins that may also precipitate with ethanol, and can appear in the product recovered by precipitation.

In conclusion, the results shown herein demonstrated that the addition of soybean oil and Tween 80 enhanced the production of the exopolysaccharide botryosphaeran, possibly by means of either providing an additional energy source to the fungus thus saving glucose for polymerisation into β -glucan, or directly interacting with cell membranes where the glucan synthase complexes are located, thereby enhancing the release of the exopolysaccharide into the extracellular fluid, as proposed in earlier reports [9, 12]. Preliminary structural characterisation of botryosphaeran produced under such conditions revealed that the addition of both soybean oil and Tween 80 did not affect any structural features, as no difference was observed between the product obtained in this work and that of other botryosphaerans [6, 7]. No reports available in the scientific literature have studied the effects of oils and surfactants on the production of exopolysaccharides using the response surface methodology. The factorial approach used in this work proved to be a valuable tool in screening for significant variables and their ranges, as well as identifying the occurrence of interactions amongst the variables studied.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES and Fundação Araucária (Projeto N° 5777) – PR, Brazil for a research grant. Mr. C.C. Silva acknowledges CAPES for a post-graduate scholarship, and Dr. R.F.H. Dekker is grateful to CNPq for a senior Visiting Research Fellowship. Dr. I.S. Scarminio is thanked for valuable suggestions regarding the statistical treatment.

References

- [1] Kang KS, Cottrell I. In: Pepler HJ, Perlman D, editors. Polysaccharides in Microbial Technology. New York: Academic Press; 1979: p. 417.

- [2] Sutherland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. TIBTECH 1998, 16: 42-46.
- [3] Coviello T, Palleschi A, Grassi M, Matricardi P, Bocchinfuso G, Alhaique F. Scleroglucan: a versatile polysaccharide for modified drug delivery. *Molecules* 2005, 10: 6-33.
- [4] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of anti-tumor and immuno-modulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 60: 258-274.
- [5] 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* 2002, 34: 51-55.
- [6] Barbosa AM, Stelutti RM, Dekker RFH, Cardoso MS, Silva MLC. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomycetous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research* 2003, 338: 1692-1698.
- [7] Steluti RM, Giese EC, Piggato MM, Sumiya AFG, Covizzi LG, Job AE, Cardoso MS, Silva MLC, Dekker RFH, Barbosa AM. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomycetous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *J Basic Microbiol* 2004, 44: 480-486.
- [8] Corradi da Silva ML, Izeli NL, Martinez PF, Silva IR, Constantino CJL, Cardoso MS, Barbosa AM, Dekker RFH, Da Silva GVJ. Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources : a comparative study. *Carbohydrate Polymers* 2005, 61: 10-17.
- [9] Stasinopoulos SJ, Seviour RJ. Stimulation of Exopolysaccharide Production in the Fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering* 1990, 36: 778-782.
- [10] West TP, Reed-Hamer B. Effect of oils and surfactants on pullulan production relative to nitrogen source. *Microbios* 1995, 83: 249-259.

- [11] Youssef F, Biliaderis CG, Roukas T. Enhancement of Pullulan Production by *Auerobasidium pullulans* in Batch Culture Using Olive Oil and Sucrose as Carbon Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998, 74: 13-30.
- [12] Yang FC, Ke YF, Kuo SS. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb Technol* 2000, 27: 295-301.
- [13] Angelova B, Schmauder HP. Lipophilic compounds in biotechnology – interactions with cells and technological problems. *Journal of Biotechnology* 1999, 67: 13-32.
- [14] Garcia JE, Vilas-Boas LA, Dekker RFH, Fungaro MHP, Barbosa AM. GenBank, 29 Apr. 2004; Accession Number: AY612337.
- [15] Montgomery DC. Design and analysis of experiments. New York: John Wiley & Sons; 2005. p. 430.
- [16] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-356.
- [17] Hartree EF. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972; 48: 422-427.
- [18] Park JP, Kim YM, Kim SW, Hwang HJ, Cho YJ, Lee YS, Song CH, Yun JW. Stimulatory effects of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb Technol* 2002, 31: 250-255.

Table 1. Box-Behnken experimental design matrix defining conditions for glucose, soybean oil and Tween 80 concentrations on botryosphaeran production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, and the responses obtained. (Cultures were grown for 72 h using a standard inoculum volume of 7 ml 100 ml⁻¹ culture medium and initial pH 5.7).

Run	Variables in coded levels			Responses			
	x_1	x_2	x_3	Mycelium (g l ⁻¹)	EPS (g l ⁻¹)	Residual glucose (g l ⁻¹)	Final pH
1	-1	-1	0	5.29	0.76	0.09	4.78
2	1	-1	0	10.56	2.05	21.89	4.10
3	-1	1	0	8.93	2.86	0.17	4.41
4	1	1	0	14.12	8.12	5.59	4.50
5	-1	0	-1	8.60	0.82	0.07	5.45
6	1	0	-1	13.29	1.41	15.77	3.56
7	-1	0	1	6.55	2.90	0.13	4.00
8	1	0	1	10.89	5.10	19.07	3.70
9	0	-1	-1	8.59	1.02	0.14	4.10
10	0	1	-1	15.17	1.56	0.16	4.39
11	0	-1	1	10.07	2.17	0.11	5.00
12	0	1	1	10.98	6.86	0.28	4.78
13 (C)*	0	0	0	9.80	4.42	0.16	4.45
14 (C)	0	0	0	10.14	3.97	0.14	4.71
15 (C)	0	0	0	9.97	4.19	0.15	4.58

Factors	Real values		
	-1	0	1
x_1 , glucose (g l ⁻¹)	10	30	50
x_2 , soybean oil (ml l ⁻¹)	0	5	10
x_3 , Tween 80 (g l ⁻¹)	0	2.5	5

* (C) = central runs

Legends to Figures

Figure 1. Response surface plot depicted as a three-dimensional surface for the production of botryosphaeran (\hat{y} , g l⁻¹) by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 as a function of the concentrations of soybean oil (x_2 , ml l⁻¹) and Tween 80 (x_3 , g l⁻¹). The glucose concentration (x_1) was 40 g l⁻¹.

Figure 2. A comparison of the FT-IR spectra of the botryosphaerans produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 when grown on basal media in the absence (A) and combined presence of Tween 80 and soybean oil (B).

Figure 3. Profile showing the fractionation of the botryosphaeran produced under optimised growth conditions in the presence of soybean oil and Tween 80 by gel permeation chromatography of on a Sepharose CL 4B column.

(□) A_{625 nm}: Blue Dextran; (●) A_{490 nm}: Botryosphaeran

Figure 4. HPAEC analysis of the monosaccharide produced on total acid hydrolysis of botryosphaeran produced under optimised conditions of growth in the presence of soybean oil and Tween 80.

Fig. 1

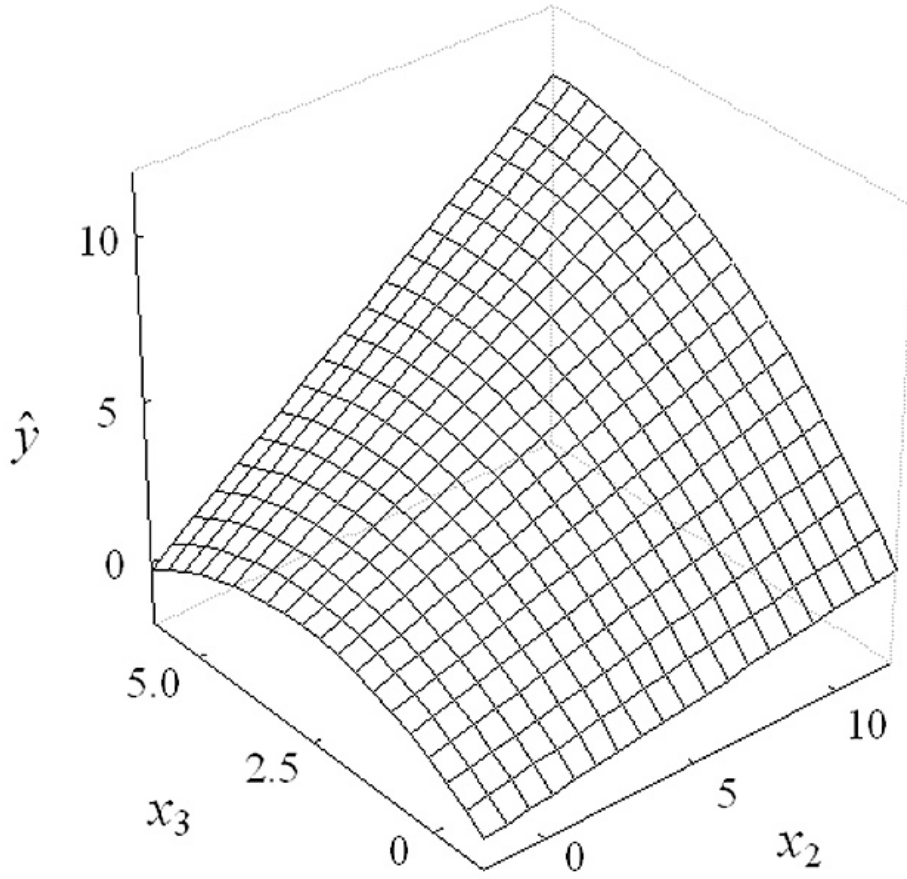


Fig. 2

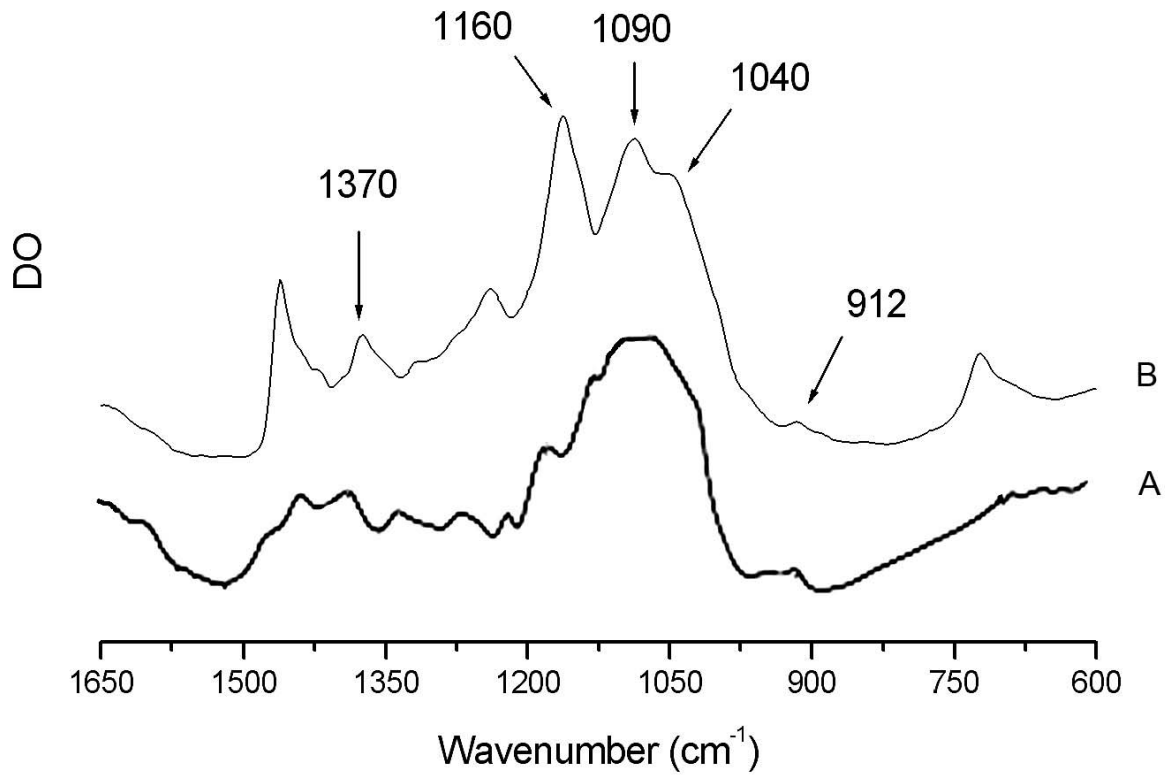


Fig. 3

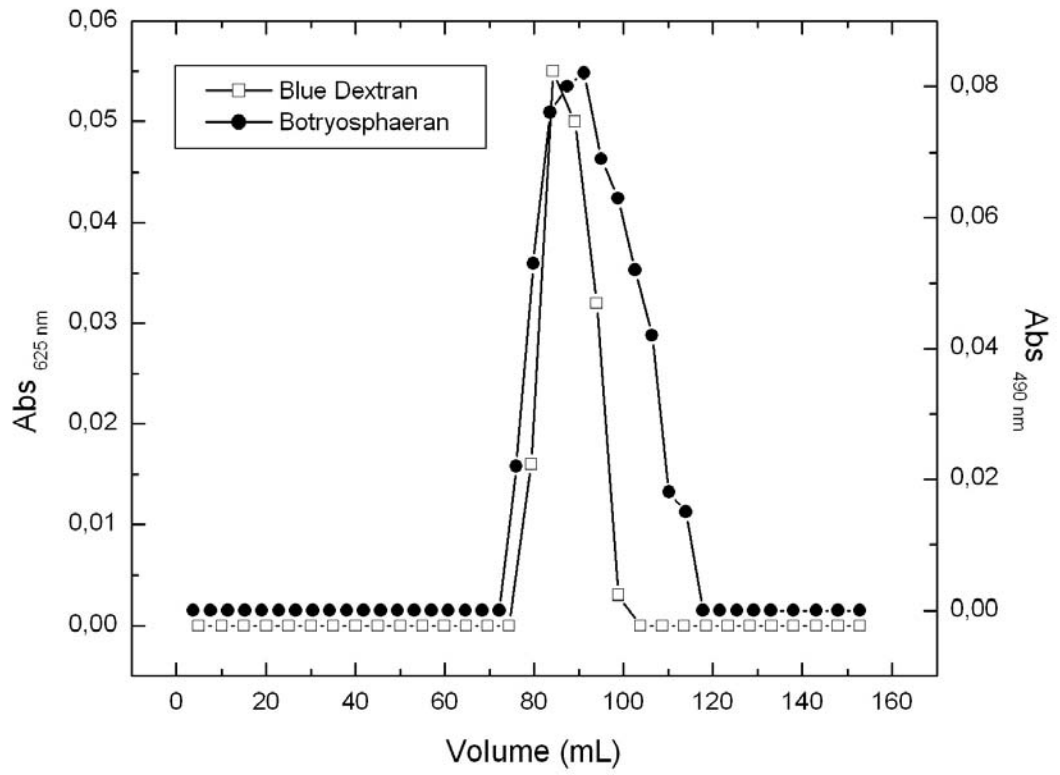
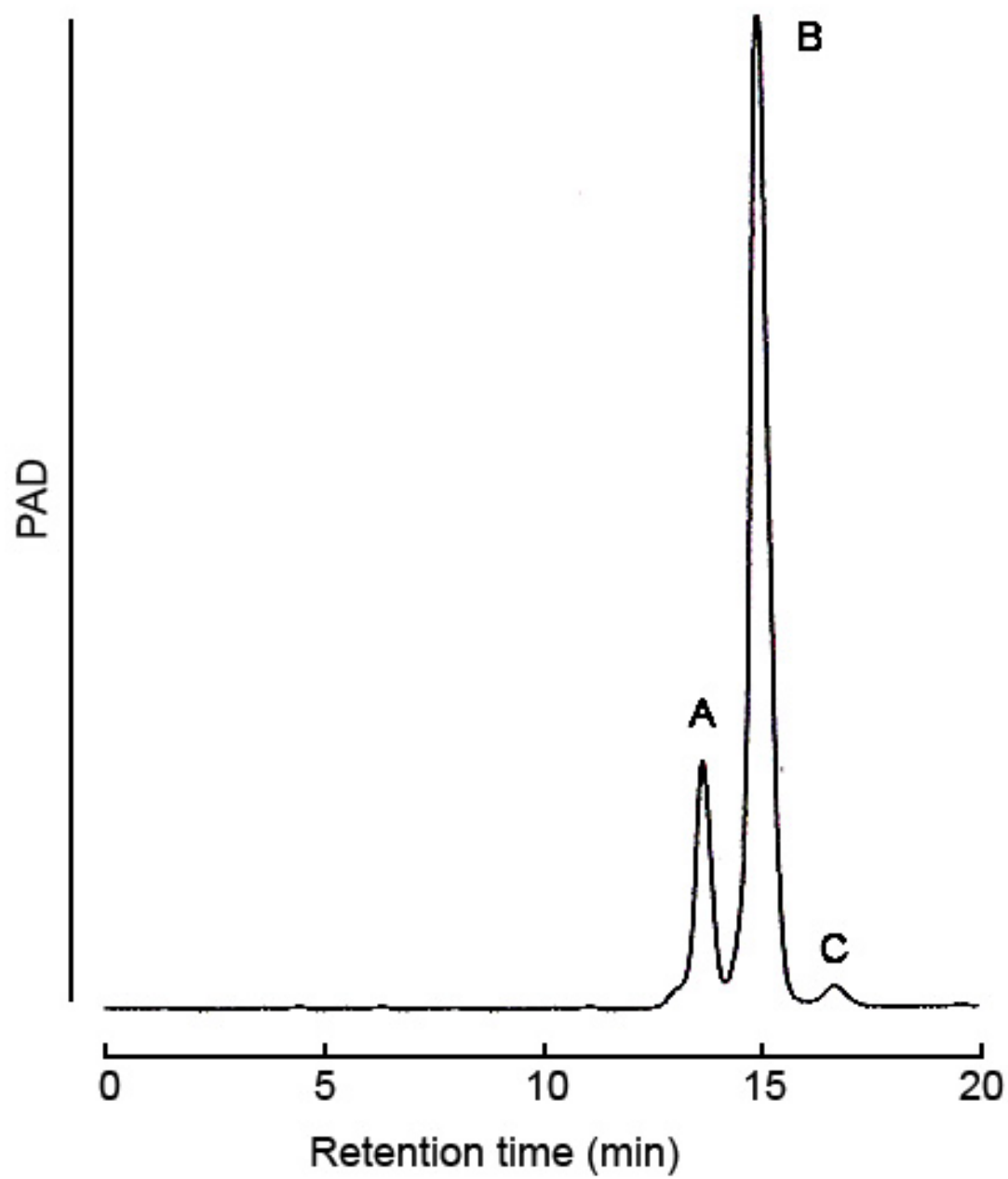


Fig. 4



ANEXOS

ANEXO A**Composição nominal do óleo de soja Liza**

ANEXO A – Composição nominal do óleo de soja Liza

Informação Nutricional (porção de 15 mL)		
Quantidade por porção		%VD*
Valor calórico	120 kcal	5
Carboidratos	0 g	0
Proteínas	0 g	0
Gordura total	14 g	17
Gorduras saturadas	2 g	8
Gorduras monoinsaturadas	4 g	-
Gorduras poliinsaturadas	8 g	-
Colesterol	0 mg	0
Sódio	0 mg	0
Vitamina E	2 mg	20 % IDR*

(*) Valores diários com base em uma dieta de 2000 kcal

(**) Ingestão Diária Recomendada

Ingredientes: óleo de soja refinado, conservante ácido cítrico

ANEXO B**Guia para autores do periódico Process Biochemistry**

ANEXO B – Guia para autores do periódico Process Biochemistry

PROCESS BIOCHEMISTRY

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described, 4) the transfer of copyright from the author to the publisher.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the

issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Format and type of manuscripts

Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. Page numeration starts from the first page. The Results & Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six

keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. *Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture*. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. Jpn. Patent. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing: For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway, <http://authors.elsevier.com>. Process Biochemistry has no page charges

For full and complete Guide for Authors, please refer the World Wide Web: <http://www.elsevier.com/locate/procbio>