

# Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos

## Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides

Aneli M. Barbosa<sup>1\*</sup>, Paulo D. T. da Cunha<sup>2</sup>, Mariane M. Pigatto<sup>2</sup> e Maria de Lourdes Corradi da Silva<sup>3</sup>

### Resumo

---

Exopolissacarídeos são polímeros de monossacarídeos secretados no meio de cultivo, que apresentam diferentes aplicações industriais. Existem poucos artigos científicos sobre a produção, caracterização e aplicações de exopolissacarídeos (EPS) fúngicos. A maioria das pesquisas neste campo tem se concentrado em EPS de bactérias, as quais possuem crescimento mais rápido. O objetivo do presente trabalho foi revisar a literatura publicada sobre EPS fúngicos, relatando os parâmetros de cultivo dos fungos, o efeito de fontes de carbono, nitrogênio orgânico e inorgânico, aeração, agitação, microelementos, adição de antiespumantes e fatores de crescimento na produção de EPS. Também foram revisados os métodos utilizados para recuperar EPS fúngicos, bem como para a sua caracterização. Algumas propriedades reológicas do meio de cultivo e as aplicações dos EPS também foram descritas. **Palavras-chave:** Exopolissacarídeos, Glucanas, Produção de Exopolissacarídeos Fúngicos

### Abstract

---

Exopolysaccharides are polymers of monosaccharides which are secreted in the culture medium and allow for different industrial applications. There are few scientific reports on the production, characterization and applications of fungal exopolysaccharides (EPS). Most research in the field has been concentrated on bacterial EPS, since bacteria are easier to grow. The objectives of the present work were to review the literature on fungal EPS, reporting fermentation parameters for growing fungi, and the effect of carbon source, organic and inorganic nitrogen, aeration, agitation, microelements, addition of antifoam, and factors of growth on EPS production. The methods for recovering fungal EPS as well as their characterization, some rheological properties of the culture medium, and EPS applications were also described.

**Key words:** Exopolysaccharides; Glucans; Production of fungal exopolysaccharides.

### Introdução

Polissacarídeos, também chamados glicanas, são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera, como por exemplo celulose e amido nas

plantas (GLAZER; NIKAIDO, 1995) e glicogênio nos animais.

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados

---

<sup>1</sup> Prof<sup>o</sup> Associado do Depto de Bioquímica - CCE/ UEL/Londrina, PR. Email: aneli@uel.br

<sup>2</sup> Alunos do Curso de Especialização em Bioquímica Aplicada /Depto de Bioquímica –CCE/ UEL/Londrina, PR.

<sup>3</sup>Prof<sup>o</sup> Assistente-Doutor do Depto de Física, Química e Biologia – FCT/UNESP/Pres. Prudente, SP.

\* Autor para correspondência.

à superfície das células ou são excretados para o meio extracelular, na forma de limo (SUTHERLAND, 1998). Nos fungos, os EPS constituem uma importante percentagem da biomassa, participando com mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede da hifa (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINEZ, 1996).

As primeiras observações sobre casos de polimerização com a formação de polissacarídeos, foram feitas em caldo de cana e descritas por Vauquelin, em 1822. Somente 40 anos depois, Pasteur descreveu observações semelhantes, demonstrando que essa polimerização era provocada por microrganismos. Entretanto, segundo Lima et al. (1992), não identificaram o tipo de microrganismo.

O polissacarídeo mais importante, obtido por fermentação, foi o dextrana, descrito por Scheibler em 1874. Possui a fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , é produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, isolada e nominada pela primeira vez por Van Tieghen em 1880. Somente em meados do século XX, Grönwall e outros pesquisadores descreveram o uso e processos de fabricação de dextrana (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1992). Portanto, foi a partir do dextrana que se iniciou e se desenvolveu o estudo dos exopolissacarídeos microbianos. Primeiramente, houve um desenvolvimento mais acentuado sobre a produção de EPS produzidos por bactérias e posteriormente, por fungos, dentre os quais o mais estudado tem sido o *Aureobasidium pullulans* (SEVIOUR et al., 1992).

Os EPS produzidos por fungos podem ser heteropolissacarídeos ou homopolissacarídeos. Vários tiveram suas estruturas químicas caracterizadas. A Tabela 1 mostra a ordem cronológica dos artigos citados por Seviour et al. (1992) e de outros revisados neste trabalho, acerca do estudo destas biomoléculas fúngicas, especificando a composição monomérica e o tipo de ligação glicosídica constituinte.

Conforme mostra a Tabela 1, a maioria dos exopolissacarídeos fúngicos é  $\beta$ -glucana. As

propriedades físicas e fisiológicas dos polissacarídeos são determinadas pelas diferenças químicas tais como: tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídica (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINÉZ, 1996). Por exemplo, grandes variações no grau de ramificação desses polímeros podem afetar a sua solubilidade (SUTHERLAND, 1998). Outro exemplo, são as propriedades reológicas e atividade antitumor apresentadas pelas glucanas extracelulares do tipo  $\beta$ , especialmente glucanas  $\beta(1\rightarrow3)$ , propriedades estas não verificadas em glucanas do tipo  $\alpha$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$  ou  $\beta(1\rightarrow6)$ . Esta atividade está relacionada à organização da estrutura ligada em  $\beta(1\rightarrow3)$  em tripla hélice e também com a complexidade da ramificação lateral e seu peso molecular (SCHIMID et al., 2001). A composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente na produção dos EPS microbianos.

Os microrganismos são adaptados ao meio ambiente natural onde vivem, pois nele existem fatores limitantes como fontes de carbono e nitrogênio, aeração, agitação, microelementos entre outros, e isso confere a eles um estado de homeostase. Na produção de EPS por fungos, deve ser considerada a cepa fúngica escolhida como também o seu meio ambiente natural para adequar, em laboratório, o meio de cultivo em termos de características nutricionais.

Parâmetros que interferem na produção dos exopolissacarídeos fúngicos

## Fontes de carbono

A produção de  $\alpha$  e  $\beta$  glucanas por fungos parece depender do tipo de fonte de carbono e da concentração usada. Em geral, se a fonte de carbono pode ser metabolizada pelo fungo, ela também pode promover a produção de EPS, mas nem sempre na mesma extensão (SEVIOUR et al., 1992).

Várias são as fontes de carbono estudadas para a produção de EPS fúngicos: glucose, sacarose,

**Tabela 1** – Homo - e heteroexopolissacarídeos produzidos por fungos filamentosos(\*)

<b>Fungo</b>	<b>Monossacarídeo(s)</b>	<b>Ligação glicosídica</b>	<b>Autor(es)</b>
<i>Sclerotium glucanicum</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Johnson et al.
<i>Plectonia occidentalis</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Davis et al.
<i>Helotium sp</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Davis et al.
<i>Claviceps fusiformis</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ com ramificações	Buck et al.
<i>Alternaria solani</i>	glucose, galactose, glucosamina	desconhecida	Goatley
<i>Schizophyllum commune</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Kikumoto et al.
<i>Monilia fructicola</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$	Feather & Malek
<i>Stereum strigosum-zonatum</i>	Manose, galactose	desconhecida	Bender
<i>Monilinia fructigena</i> (a)	Manose, galactose	$\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow2)$ com possíveis $\alpha$ ligações	Archer et al.
<i>Monilinia fructigena</i> (b)	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Santamaria et al.
<i>Aspergillus nidulans</i>	Galactosamina, acetato, galactose	$\alpha$ -ligações	Leal & Rupérez
<i>Botrytis cinerea</i> (a)	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$ e $\beta(1\rightarrow4)$	Leal et al.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	glucose, malato	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Leal-Serrano et al.
<i>Botrytis cinerea</i> (b)	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Dubourdiou et al.
<i>Aspergillus flavus</i>	Manose e galactose	$\beta(1\rightarrow2)$	Kardosová & Rosík
<i>Acremonium diostryi</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$ e $\beta(1\rightarrow4)$	Seviour & Hensgen
<i>Penicillium erythromellis</i>	glucose, malonato	$\beta(1\rightarrow6)$ e ?	Rupérez et al.
<i>Pestalotia sp.</i> 815	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Misaki et al.
<i>Ulocladium atrum</i>	manose, arabinose, glicerol	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Martínez et al.
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	glucose, galactose	desconhecida	Sarkar et al.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (a)	glucose, arabinose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Bes et al.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (b)	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Buchala & Leisola
<i>Epicoccum purpurascens</i>	Glucose	$\beta$ -ligações	Michel et al.
<i>Phytophthora parasitica</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Bruneteau et al.
<i>Acremonium persicinum</i>	Glucose	$\beta$ -ligações	Stasinopolous & Seviour
<i>Glomerella cingulata</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Gomaa et al.
<i>Laetisaria arvalis</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Aouadi et al.
<i>Aureobasidium pullulans</i> p56	Glucose	$\alpha(1\rightarrow6)$	Schuster et al.
<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348	Glucose	$\alpha(1\rightarrow6)$	Gibbs & Seviour
<i>Pleurotus ostreatus</i>	glucose, manose, galactose		Gutiérrez et al.
<i>Fusarium solani</i>	manose, galactose, glucose, pentose	desconhecida	Polycarpo et al.
<i>Aureobasidium pullulans aubasidani</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$	Yurlova & Hoog
<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348	Glucose	$\alpha(1\rightarrow6)$	Gibbs & Seviour
<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC 201126	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	Fariña et al.
<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRLY-6220	Glucose	$\alpha(1\rightarrow6)$	Barnett et al.
<i>Schizophyllum commune</i>	Glucose	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	Maziero et al.

(\*)Dados apresentados em ordem cronológica, atualizados a partir de Seviour et al.(1992).

maltose, lactose, frutose, galactose, xilose, celobiose, sorbitol, xilitol, manitol, arabinose, inositol e diferentes tipos de farinha tais como mandioca, milho, batata, etc (SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002; IZELI et al., 2003). Por meio da revisão da literatura, foi observado que a glucose e sacarose têm sido as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de EPS fúngicos (SEVIOUR et al., 1992; SCHUSTER; WENZIG; MERSMANN, 1993; FARIÑA et al., 1998; BAE et al., 2000, PIGATTO, 2002; DEKKER; BARBOSA, 2001).

A concentração de glucose utilizada nos meios de cultivo para produção de EPS tem variado de 1,6 g/L para a produção de glucana pelo *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725 (LEISOLA et al., 1982) até 39 g/L para a produção de EPS por outros *Basidiomicetos* (MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999). Entretanto para a sacarose, têm sido observadas variações desde 30 g/L, para a produção de exo-biopolímeros pelo *Paecilomyces japonica* (BAE et al., 2000) até 150 g/L para a de escleroglucana pelo *Sclerotium rolfsii* ATCC201126 (FARIÑA et al., 1998).

Existe um tempo de cultivo e uma concentração ótima de fonte de carbono para a produção de EPS para cada microrganismo. Isso foi demonstrado por Maziero, Cavazzoni e Bononi (1999), quando compararam a produção de EPS pelo *Agaricus sp.* (CCB280) com a de *Oudemansiella canarii* (CCB179), após 7 dias de cultivo, em meio contendo 39 g/L de glucose.

Da mesma forma, a importância da concentração de uma mesma fonte de carbono foi demonstrada por Fariña et al. (1998), quando estudaram o *Sclerotium rolfsii* ATCC201126, que produziu aproximadamente quatro vezes mais escleroglucana quando cultivado em 150 g/L de sacarose do que em 20 g/L da mesma fonte. Leisola et al. (1982), cultivaram o *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725 em glucose, variando a sua concentração de 2,4 g/L até 6,0 g/L, em frascos contendo o mesmo meio de cultivo. Esses

pesquisadores observaram que o microrganismo consumiu níveis similares desta fonte de carbono nos 7 primeiros dias de cultivo e o consumo de glucose pelo fungo não ultrapassou 2,4 g/L, em frascos agitados, independentemente das maiores concentrações estudadas.

Segundo Bae et al. (2000), existe uma proporcionalidade entre a produção de exopolissacarídeo e o crescimento micelial pelo fungo *Paecilomyces japonica*. Experimentos realizados com este microrganismo utilizando-se 10, 20, 30, 40 e 50 g/L de maltose, demonstraram que o maior crescimento micelial foi obtido em 30 g/L de maltose concomitantemente com a a maior produção de EPS. Bae et al. (2001), também avaliaram a produção de EPS pelo *Paecilomyces japonica*, em reator, e verificaram que a maior produção foi em maltose quando comparado com cultivos em sacarose, tendo sido obtidos 30 g/L e 25 g/L, respectivamente. Porém, em frascos agitados, a produção de EPS pelo referido microrganismo foi aproximadamente 6 g/L para estas duas fontes de carbono. Entretanto, pelo fato da sacarose ter um custo mais acessível do que a maltose e ter conduzido a uma boa produção de EPS, em reator, ela foi a fonte selecionada pelos referidos pesquisadores.

### Fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio

Um outro fator nutricional importante para a produção efetiva do EPS é a fonte de nitrogênio. As fontes orgânicas mais utilizadas são: peptona, glutamato, L-asparagina, extrato de levedura, succinato de amônio entre outras. Entre as inorgânicas, podem ser citadas: sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio, etc (SEVIOUR et al., 1992; KRCMAR et al., 1999; BAE et al., 2000).

Tem sido descrito que polissacarídeos são produzidos somente sob condições de nitrogênio limitantes e que altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de EPS. Este efeito tem sido observado em vários fungos produtores de

$\beta$ -glucanas. Entretanto, acredita-se que este tipo de regulação depende da fonte de nitrogênio utilizada. Os sais de amônio são, freqüentemente, mais eficientes do que a maioria dos outros sais inorgânicos e, particularmente, do que as fontes de nitrogênio orgânicas (SEVIOUR et al., 1992).

Relatos da literatura mostram que as concentrações de sulfato de amônio têm variado de 0,6 g/L para a produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans* ATCC9348 (GIBBS; SEVIOUR, 1996) até 5,0 g/L para a produção de EPS por certos *Basidiomicetos* (MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999). As concentrações de nitrato de sódio estudadas tem variado de 0,08g/L para a produção de epiglucana pelas cepas de *Epicoccum nigrum* (SCHMID et al., 2001) até 2,25 g/L na produção de escleroglucana pelo *Sclerotium rolfsii* ATCC201126 (FARIÑA et al., 1998).

Cepas de *Aureobasidium pullulans aubasidani* produziram aubasidana utilizando-se preferencialmente nitrato de sódio, enquanto cepas de *Aureobasidium pullulans pullulans* produziram pululana utilizando sulfato de amônio. Portanto, cepas de *Aureobasidium pullulans* podem ter preferências diferentes por fontes de nitrogênio, levando à produção de diferentes exopolissacarídeos (YURLOVA; HOOG, 1997).

A fonte de nitrogênio influenciou diretamente a produção de EPS pelo *Sclerotium rolfsii* ATCC201126 que produziu aproximadamente 2 g/L de escleroglucana em sais de amônio e 5 g/L em sais de nitrato em um mesmo tipo de meio de cultivo. Portanto, acredita-se que este microrganismo sofreu uma adaptação durante o processo evolutivo (FARIÑA et al., 1998).

O crescimento micelial e a produção de EPS pelo *Paecilomyces japonica* estão diretamente relacionados. Bae et al. (2000) verificaram que a maior produção de EPS para este microrganismo foi obtida em fonte orgânica de nitrogênio e, mais especificamente, em 6 g/L de extrato de levedura.

Portanto, pelos resultados descritos na literatura, acredita-se que existem preferências específicas quanto à fonte de nitrogênio, as quais estão

diretamente vinculadas ao metabolismo de cada microrganismo.

## Aeração

As taxas de aeração para a produção de EPS variam significativamente. A produção de  $\beta$ -glucana pelo *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725 (BUCHALA; LEISOLA, 1987) foi a mesma (140 mg/L), independentemente da taxa de aeração estudada, que variou de 0,05 a 0,4 litro por minuto (vvm). Por outro lado, Roukas e Liakopoulou-Kyriakides (1999) verificaram que a produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans* P56 foi maior (23 g/L) na taxa de aeração de 1 vvm, quando comparado com os cultivos sem fornecimento de ar (12 g/L) e com aeração de 0,5 vvm (14 g/L).

Wang e McNeil (1995) estudaram a produção de escleroglucana pelo *Sclerotium glucanicum* NRRL3006 em reator. Variaram o fluxo de ar de 100 dm<sup>3</sup>/min durante 96h e em seguida, decresceram-no para 20 dm<sup>3</sup>/min. Estes dois estágios promoveram um ligeiro aumento na produção de escleroglucana.

Gibbs e Seviour (1996) também estudaram a produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans* ATTC 9348 em fermentador e demonstraram que existe uma influência negativa de altos níveis de oxigênio dissolvido sobre a produção de EPS neste microrganismo.

Portanto, para a produção de EPS deve-se estudar as condições de aeração mais apropriadas para cada microrganismo. Para alguns fungos, a aeração pode não afetar a produção, enquanto que para outros, pode aumentar ou mesmo diminuí-la.

## Agitação

A função da agitação no meio de cultivo é melhorar a distribuição de oxigênio e outros nutrientes para as células fúngicas. A maioria dos estudos sobre a influência da taxa de agitação sobre a produção de EPS, por fungos, tem sido feita com cepas de *Aureobasidium pullulans*, um produtor de pululana.

Gibbs e Seviour (1996) estudaram uma grande variedade de taxas de agitação para a produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans* ATTC 9348, em fermentador. Os autores constataram que a produção do referido EPS em velocidades de agitação menores como 125 e 250 rpm, sem controle do nível da pressão de oxigênio para as células, foi satisfatória devido aos baixos níveis de oxigênio que atingiram as células, nestas condições de agitação. Também verificaram que a produção poderia melhorar significativamente em altas velocidades de agitação como 1000 rpm, desde que fosse diminuída a pressão de oxigênio para as células, ou seja, que houvesse um controle da pressão. Estas conclusões parecem demonstrar que, independentemente da taxa de agitação, a produção de EPS é afetada pelo nível da pressão de oxigênio no fermentador.

## Microelementos

Microelementos são sais inorgânicos utilizados em pequenas quantidades pelas células fúngicas, os quais compreendem metais e não metais essenciais à composição de enzimas, vitaminas, proteínas, nucleotídeos, etc. São substâncias consideradas estabilizadoras destas macromoléculas. Os microelementos mais utilizados para a produção de EPS por fungos são:  $K_2HPO_4$ , KCl,  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ , NaCl,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MnSO_4$ , entre outros. Normalmente, o fosfato e sulfato são requeridos em maiores concentrações pelos microrganismos em comparação com os outros sais inorgânicos. Fosfato é um constituinte dos fosfolípidos e ácidos nucleicos e é também um regulador de certas enzimas do metabolismo primário e secundário. Sulfato é necessário para a biossíntese de aminoácidos sulfurados e metabólitos secundários, como por exemplo os antibióticos (GRESHAM, R.L.; HERBER, W.K., apud RHODES; STANBURY, 1997, p.51-74).

Entre vários sais inorgânicos o fosfato de potássio levou à maior produção de micélio pelo *Paecilomyces japonica*, apesar dos sais  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , e  $KH_2PO_4$  também terem sido favoráveis ao seu crescimento (BAE et al., 2000).

Entre vários sais inorgânicos, o  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  foi o que promoveu menor produção de micélio pelo *Paecilomyces japonica*, apesar do  $ZnCl_2$  também não ter favorecido o seu crescimento (BAE et al., 2000).

A otimização do meio de cultivo para o crescimento micelial de *Paecilomyces japonica* se deu com 0,5 g/L de  $K_2HPO_4$ , 0,2 g/L de  $KH_2PO_4$ , 0,2 g/L de  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  e 0,2 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (BAE et al., 2000).

Mais estudos deverão ser realizados para se inferir quais os efeitos dos sais inorgânicos sobre o cultivo de diferentes fungos produtores de EPS. Por exemplo, pesquisar a composição em sais minerais necessária para promover um aumento da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da produção dos exopolissacarídeos fúngicos.

## Adição de anti - espumantes

A produção de polissacarídeos por fungos cultivados em tanques agitados ou fermentadores aerados, leva à formação de grandes quantidades de espuma estável, que é comumente controlada com produtos químicos. Recentemente, tem sido demonstrado que alguns destes produtos químicos anti-espumantes, como polipropileno glicol 2025, inibiram severamente a produção de  $\beta$ -glucana para os fungos *Acremonium persicinum* C38 e *Epicoccum purpurascens* E41, além de alterarem a morfologia dos mesmos. A produção de polissacarídeo pelo *Aureobasidium pullulans* ATCC3092 não foi afetada. O mecanismo de inibição não é conhecido, porém estes produtos químicos podem afetar a via biossintética direta ou indiretamente, afetando a taxa de transferência de massa do oxigênio ou a morfologia do fungo. Entretanto, estas observações mostram que cuidados devem ser tomados na escolha dos agentes antiespumantes para a produção de glucanas (SEVIOUR et al., 1992).

Por outro lado, quando outros produtos químicos foram testados, como vários óleos vegetais e seus constituintes em ácidos graxos, houve um expressivo

aumento na produção de EPS pelo *Acremonium persicinum* C38. Por exemplo, o óleo de oliva e o óleo de girassol favoreceram a produção de EPS que foi de aproximadamente 30 g/L, quase o dobro da produção do controle. Ainda se desconhece como estes óleos agem, entretanto a falta de correlação entre os níveis de estimulação e o grau de insaturação sugere que eles não agem modificando a função e a estrutura da membrana celular, como sugerido em outros sistemas (SEVIOUR et al., 1992).

Bevaloid 5397, um óleo mineral, inibiu a produção de EPS pelo *Acremonium persicinum* C38 porém, nenhum dos anti-espumantes à base de silicone, incluindo-se “Dow Corning AF”, Anti-espumante 1520 e o Gensil 32 (Bevaloid), afetaram a produção de EPS. Entretanto, na presença destes mesmos anti-espumantes, o *A. persicinum* C38 cresceu na forma micelial formando grandes massas esféricas (STASINOPOULOS; SERVIOR; AUER, 1989).

### Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são fontes acessórias, principalmente de carbono, nitrogênio e microelementos, que servem para incrementar o cultivo de microrganismos. Os fatores de crescimento escolhidos dependem da fisiologia e do meio de cultivo das cepas fúngicas produtoras de EPS. São fatores de crescimento as vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos e microelementos, entre outros. Por exemplo, a adição de óleo de girassol e óleo de oliva e seus constituintes em ácidos graxos, diminuíram a produção de escleroglucana pelo *Sclerotium rolfsii* ATCC201126 (FARIÑA et al., 1998). Porém a adição dos mesmos aumentou a produção de EPS pelo *Acremonium persicinum* C38 (SEVIOUR et al., 1992). Portanto, os fatores de crescimento devem ser avaliados para cada microrganismo em estudo.

### Recuperação e quantificação de exopolissacarídeos fúngicos

Os exopolissacarídeos fúngicos são recuperados do meio de cultivo de forma semelhante aos de bactéria, ou seja, através de centrifugação, filtração, agentes precipitantes de EPS, diálise e liofilização.

As centrifugações são utilizadas para separar as células, sedimentando-as do EPS solúvel presente no meio extracelular. Também são utilizadas para auxiliar na precipitação posterior dos EPS presentes no sobrenadante, após tratamento com agentes precipitantes. O etanol é o agente precipitante mais comum, embora isopropanol ou cetonas podem também ser utilizados. A relação volume de etanol : volume de sobrenadante do meio de cultivo mais utilizada tem sido 2:1 (WANG; McNEIL, 1995; BARNETT et al., 1999; ROUKAS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 1999; SCHMID et al., 2001). Porém um, três ou até mesmo quatro vezes o volume de etanol também têm sido empregado com sucesso por alguns pesquisadores (BUCHALA; LEISOLA, 1987; KRCMAR et al., 1999; BAE et al., 2001)

Os EPS fúngicos têm sido quantificados através de pesagem após liofilização (BAE et al., 2001), ou pela quantificação de seus açúcares redutores após digestão enzimática (WEST, 2000), ou ainda determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (YURLOVA; HOOG, 1997; BARBOSA et al., 2003).

A importância de um bom método para a recuperação e quantificação dos EPS fúngicos do meio de cultivo, reside no fato de possibilitar a comparação da produção de EPS por uma ou outra cepa fúngica.

### Caracterização dos exopolissacarídeos fúngicos

Antes que a caracterização química seja iniciada, é necessária a purificação do EPS, geralmente a parte mais laboriosa.

Procedimentos de purificação devem ser efetuados até que a composição da macromolécula em estudo se mantenha constante por, pelo menos, dois diferentes métodos (PAZUR, 1994). Sabendo-se que o comportamento dos polissacarídeos nas cromatografias de filtração em gel ou em troca iônica fornece informações acerca da pureza da preparação polissacarídica e que a simetria no pico de eluição é sinal de homogeneidade (DANISHEFSKY; WHISTLER; BETTELHEIM, 1970; BOYER, 1993) esses métodos cromatográficos são, geralmente, os primeiros utilizados nos procedimentos de purificação.

Para analisar a estrutura de um polissacarídeo é necessário, primeiro, determinar os tipos de resíduos monossacarídicos que constituem o composto biológico.

Com o advento de métodos cromatográficos, a determinação da composição monossacarídica é relativamente simples. Para isso, é imprescindível que o polissacarídeo seja, antes, hidrolisado em suas unidades constituintes.

A cromatografia em papel, uma técnica simples e de baixo custo, é utilizada para identificar qualitativamente os monossacarídeos, obtidos por hidrólise, do EPS (YURLOVA; HOOG, 1997). A cromatografia em camada delgada utilizada para o mesmo fim (POLYCARPO et al., 1997) apresenta melhor resolução e rapidez, quando comparada à cromatografia em papel.

Métodos mais sensíveis e rápidos são cromatografia em fase gasosa (GLC) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). O primeiro método estabelece que derivados voláteis de carboidrato sejam preparados (CHAPLIN, 1994) e então identificados, usando-se detector de ionização de chama, comparando-se seus tempos de retenção àqueles de padrões, já previamente conhecidos (BUCHALA; LEISOLA, 1987; BES et al., 1987; GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTÍNEZ., 1996; YURLOVA; HOOG, 1997; SANTOS et al., 2000; SCHMID et al., 2001). Para o HPLC, não há

necessidade da derivatização pré-coluna permitindo a análise de uma menor quantidade de material. Neste caso, a detecção de carboidratos se faz por índice de refração e mais recentemente por amperometria integrada (PAD-HPAEC) (RICE; CORRADI DA SILVA, 1996; BARBOSA et al., 2003).

Métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear e infravermelho acoplado ao transformador Fourier são utilizados para identificar a configuração anomérica das ligações glicosídicas do EPS. Para essas análises, os espectros do material em estudo são comparados aos espectros de padrões, normalmente, encontrados na literatura de ressonância magnética nuclear (GORIN, 1980; BES et al., 1987; BRUNETEAU et al., 1988; GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTÍNEZ, 1996; SANTOS et al., 2000; SCHMID et al., 2001; BARBOSA et al. 2003) e infra-vermelho (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTÍNEZ, 1996; YURLOVA; HOOG, 1997; KRCCMAR et al., 1999; SANTOS et al., 2000; SCHMID et al., 2001; SILVA et al., 2003).

A análise de metilação, uma das mais comuns na caracterização de polissacarídeos, é usada para estabelecer a posição da ligação e o tipo de anel dos açúcares constituintes (MONTREUIL et al., 1994). Ela envolve a permetilação de todas as hidroxilas livres dos açúcares, seguida da liberação de monossacarídeos por hidrólise ou metanólise e análise quantitativa dos derivados metilados (BUCHALA; LEISOLA, 1987; BES et al., 1987; GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTÍNEZ, 1996; YURLOVA; HOOG, 1997; KRCCMAR et al., 1999; SCHMID et al., 2001; BARBOSA et al., 2003). Padrões de fragmentação característicos de açúcares individuais são obtidos pela combinação c.f.g.-e.m (cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa).

A oxidação do polissacarídeo pelo periodato e a determinação quantitativa do periodato consumido bem como a formação do ácido fórmico fornecem informações sobre a natureza e a proporção das

ligações glicosídicas que participam do EPS (SANTOS et al., 2000; BARBOSA et al., 2003).

A determinação da massa molar, usualmente, é realizada pela aplicação do EPS em uma coluna contendo géis permeáveis. O volume de eluição, comparado àquele de padrões de massa molar conhecida, permite determinar o peso molecular aproximado do EPS (YURLOVA; HOOG, 1997).

Esse conjunto de análises, realizado com todo critério científico, permite caracterizar a estrutura química do EPS.

### **Algumas propriedades reológicas dos meios de cultivo com exopolissacarídeos fúngicos**

A viscosidade das soluções de EPS fúngicos varia de acordo com alguns fatores físico-químicos como: pH, temperatura, concentração do EPS, massa molecular, solubilidade, além das características morfológicas dos fungos produtores (CUNHA, 2002).

A velocidade cinética do EPS varia com a viscosidade do meio de cultivo, sendo maior em meios de cultivo com baixa viscosidade e maior solubilidade, e menor em meios de cultivo com alta viscosidade e baixa solubilidade. São eles menos velozes em meios mais viscosos (maior atrito) e mais velozes em meios menos viscosos (menor atrito). A maior viscosidade do meio de cultivo promove ao EPS um caráter mais pseudoplástico e menos newtoniano, enquanto a menor viscosidade do meio de cultivo confere a ele um caráter mais solúvel e newtoniano (CUNHA, 2002).

Uma grande importância do estudo da viscosidade do meio de cultivo está na produção de EPS fúngicos em escala industrial, com menor custo de produção, em fermentador, em termos de gasto energético. Microrganismos que produzem mais EPS em um meio de cultivo mais newtoniano é o ideal para maior lucratividade (CUNHA, 2002).

Grandes variações podem ser encontradas no grau de ramificação de alguns dos polímeros de escleroglucana, uma  $\beta$ -glucana, o que pode afetar

muito sua solubilidade. Quando o escleroglucana é mais ramificado, sua solução é pseudoplástica e sua viscosidade parece não ser afetada, na faixa de 20-90°C. A oxidação química da cadeia lateral com periodato, seguida por redução com borohidreto, aumenta a atividade newtoniana do escleroglucana, possivelmente devido ao aumento da solubilidade deste EPS. O comportamento pseudoplástico do escleroglucana não é afetado por vários sais, o que proporciona uma vantagem sobre polissacarídeos polianiônicos, tais como xantana para produtos agrícolas (SUTHERLAND, 1998).

Pululana, uma  $\alpha$ -glucana, solúvel em água, produzida pelo *Aureobasidium pullulans* forma soluções viscosas estáveis na presença da maioria dos cátions, mas não forma géis. Esterificações podem ser usadas para variar suas propriedades físicas, tornando-a menos susceptível ao ataque enzimático (SUTHERLAND, 1998). A maior viscosidade de uma solução de pululana produzida pelo *Aureobasidium pullulans* P56 foi obtida em pH 8.0 a 20 °C, quando o EPS foi produzido com taxa de aeração de 1L/min (ROUKAS; LIAKOPOULOU - KYRIAKIDES, 1999).

A viscosidade da solução de pululana produzida por *Aureobasidium pullulans* ATCC9348 foi avaliada sob diferentes condições de cultivo em fermentador e observou-se que os valores foram constantes. Este resultado sugeriu que a massa molecular de pululana e seu grau de polimerização não são afetados pelo meio físico. Entretanto, segundo Lounes et al. (1995) e Audet et al. (1996), os valores de viscosidade variaram com as condições da fermentação para o *Aureobasidium pullulans* quando secretou outros polissacarídeos concomitantemente com o pululana (BOUVENG et al., 1963; LEAL-SERRANO et al., 1980; PROMMA et al. apud GIBBS; SERVIOUR, 1998).

As características morfológicas de *Paecilomyces japonica* exerceram uma influência significativa sobre a reologia do caldo contendo EPS. A forma de micélio esférico promoveu menor viscosidade do que

a forma de micélio filamentosos. O índice de comportamento de fluxo  $n$  para o micélio esférico foi perto da unidade (BAE et al., 2001). O crescimento do micélio esférico de *Paecilomyces japonica* foi obtido sob condições de baixa agitação e alta aeração e foi necessário para melhorar a produção de EPS (SINHA et al., 2001).

Segundo Wang e McNeil (1995) a viscosidade do caldo e a transferência de oxigênio para os microrganismos são variáveis inversamente proporcionais. Esse fato ocorre porque estes pesquisadores observaram elevada viscosidade do caldo fermentado, contendo escleroglucana de *Sclerotium glaucanicum* NRRL 3006, com baixas taxas de transferência de oxigênio.

### Aplicações dos exopolissacarídeos fúngicos

Vários exopolissacarídeos produzidos por microrganismos ainda não foram adequadamente explorados e somente poucos têm sido produzidos em larga escala. Muitos polissacarídeos produzidos por bactérias e fungos possuem propriedades semelhantes às do agar. Outros possuem propriedades reológicas que são valiosas para emprego industrial. Entre os polissacarídeos microbianos com usos comerciais podem ser citados xantana, dextrana, alginato, curdlana e gelana, produzidos por bactérias e a escleroglucana e pululana, produzidos por fungos. (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Os polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos ligninolíticos desempenham papel importante no processo de degradação de xenobióticos, uma vez que imobilizam as enzimas extracelulares. O gel formado por estes biopolímeros impede a desidratação da hifa e permite adesão entre as células ou a adesão destas às superfícies, além de selecionar moléculas do meio (MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999).

Os EPS microbianos são mais conhecidos por suas propriedades espessantes, geleificantes e

emulsificantes, porém outra possibilidade de aplicação destes biopolímeros é na saúde humana. Várias pesquisas sobre polissacarídeos fúngicos têm se concentrado em aplicá-los como agentes antitumorais (MAZIERO et al., 1999). Os polissacarídeos que apresentam esta atividade são todos glucanas intimamente relacionados à estrutura do escleroglucana (YANG; LIAU, 1998). Alguns polissacarídeos ricos em L-fucose também podem apresentar aplicação na área médica, evitando a colonização do pulmão por células tumorais (efeito anticancerígeno), no controle da formação de leucócitos (efeito antiinflamatório), no tratamento de artrite reumatóide, na síntese de antígenos para a produção de anticorpos (imunização) e em cosméticos como agentes de hidratação da pele (VANHOOREN; VANDAMME, 1999).

O pululana, uma  $\alpha$ -glucana produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, é resistente ao óleo e daí sua aplicação em poços de petróleo. Este EPS forma filmes solúveis em água com baixa permeabilidade ao oxigênio, reveste alimentos retendo o sabor e aparência. Soluções deste EPS podem também ser usadas para formar coberturas, sem odor e sabor, sobre matérias alimentícias. Estas aplicações têm aparentemente sido desenvolvidas no Japão, mas o uso do polímero em outros países parece ser limitado. Pululana é também um bom adesivo e pode ser usado na preparação de algumas fibras, como um componente de sistemas aquosos bifásicos. Este EPS também tem sido usado para preparar padrões de massa molecular de baixa dispersão para calibrar HPLC. Uma nova particularidade do uso de pululana é como pré-biótico para promover seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium spp* no intestino humano, seguindo sua incorporação sobre alimentos de dieta especializada (SUTHERLAND, 1998).

D-glucanas tipo  $\beta(1\rightarrow3)$  como escleroglucana (*Sclerotium glaucanicum*), esquizofilana (*Schizophyllum commune*), cinereana (*Botrytis cinerea*) e pestalotana (*Pestalotia sp*), exibem atividade contra tumores. Esta atividade antitumor parece estar relacionada à estrutura química da cadeia

principal da glucana na forma de tríplex hélice, à frequência e complexidade das cadeias laterais e à sua massa molecular (SCHMID et al., 2001).

O EPS e o micélio de *Paecilomyces japonica* apresentam atividades fisiológicas semelhantes, que incluem atividades imuno-estimuladora, antitumor e hipoglicêmica. Ambos podem ser utilizados como suplemento da dieta para aumentar a histamina, uma substância naturalmente produzida pelo organismo, para curar tosse e problemas de circulação do sangue, ou ainda como um tônico para promover a longevidade e melhorar a qualidade de vida (BAE et al., 2001).

Ensaio de atividade contra tumor das D-glucanas  $\beta(1\rightarrow3)$  de *Phytophthora parasitica* foram positivos (BRUNETEAU et al., 1988).

O EPS ramificado, uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) ou escleroglucana de *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 tem sido investigada devido ao seu potencial na recuperação de óleos, bem como pela sua capacidade de promover estímulo imunológico. Apresenta atividades antimicrobiana e antineoplásica significativamente mais elevadas do que outras  $\beta$ -glucanas (FARIÑA et al., 1998).

A participação da D-glucana  $\beta(1\rightarrow3)$  de *Phlebia radiata* Fr.79 (ATCC64658) na degradação de xenobióticos ainda não está totalmente esclarecida, embora já se conhece que as enzimas que participam da degradação de lignina também estão envolvidas na degradação de xenobióticos (KRCMAR et al., 1999) e que D-glucanas podem atuar como suporte neste processo.

## Conclusões

Diferentes fontes de carbono têm sido estudadas, entretanto a glucose e a sacarose são as mais utilizadas para a produção de EPS fúngicos.

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas têm sido estudadas para a produção de EPS fúngicos. Níveis elevados de nitrogênio reprimem a síntese de

EPS em fungos. Sais de amônio e nitrato destacam-se entre as fontes de nitrogênio inorgânicas, enquanto o extrato de levedura entre as fontes orgânicas.

A aeração pode ou não afetar a produção de EPS de acordo com o fungo em estudo.

A adição de microelementos e de fatores de crescimento devem ser avaliadas de acordo com o fungo em estudo. Entretanto, fosfato e sulfato devem ser utilizados em maiores concentrações que os demais microelementos.

A adição de antiespumantes pode ou não inibir a síntese de EPS, dependendo do fungo em estudo, afetando ou não a forma do micélio.

O etanol na proporção de 2 volumes tem sido o solvente mais utilizado para a precipitação de EPS fúngicos. Geralmente a quantificação tem sido através de pesagem após a liofilização.

A caracterização de EPS fúngicos é desenvolvida por uma seqüência de técnicas, desde as mais simples como hidrólise ácida e cromatografias em papel ou em camada delgada, até as mais sofisticadas como espectroscopia de infra-vermelho e ressonância magnética nuclear (RNM), que dependem de aparelhos específicos.

A viscosidade no meio de cultivo durante o processo de produção de EPS é importante para diminuir os gastos de produção do mesmo, em escala industrial.

Considerando-se a biodiversidade do planeta e a importância destas macromoléculas como produtos naturais bem como suas aplicações nas mais diferentes áreas, pesquisas sobre o isolamento de novas cepas fúngicas e da otimização da produção devem ser intensificadas, uma vez que a produção independe de variações sazonais e ou climáticas e, portanto, novos exopolissacarídeos poderão ser descobertos.

## Referências

- BAE, J. T. et al. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Kangnam-Ku, v.10, p.482-487, 2000.
- BAE, J. T. et al. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Suita, v.91, p.522-524, 2001.
- BARBOSA, A.M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran:  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research*, Kidlington, v.338 p.1691-1698, 2003.
- BARNETT, C. et al. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. *Carbohydrate Polymers*, Sannon, v.38, p.203-209, 1999.
- BES, B. et al. Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, London, v.9, p.310-318, 1987.
- BOYER, R. F. *Modern Experimental Biochemistry*. 2<sup>nd</sup>. California: Benjamin/Cummings 1993. p.59-114.
- BRUNETEAU, M. et al. Antitumor active  $\beta$  -D-glucans from *Phytophthora parasitica*. *Carbohydrate Research*, Kindlington, v.175, p.137-143, 1988.
- BUCHALA, A. J.; LEISOLA, M. Structure of the  $\beta$  -D-glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. *Carbohydrate Research*, Kindlington, v.165, p.146-149, 1987.
- CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (Eds.) *Carbohydrate Analysis*. Oxford: A Practical Approach. IRL, 1994. p.1-40.
- CUNHA, P.D.T. Produção de exopolissacarídeos fúngicos e suas aplicações. 2002. 36 p. Monografia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- DANISHEFSKY, I., WHISTLER, R.L.; BETTELHEIM, F.A.. In: PIGMAN, W. *The Carbohydrates*. 2<sup>nd</sup>. New York: Academic Press, 1970. v.2. p.375-412.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.28, p.81-88, 2001.
- FARIÑA, J. I. et al. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.20, n.9, p.825-831, 1998.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? *Applied Microbiology and Biotechnology*, Bingley, v.46, p.503-510, 1996.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Bingley, v.49, p.168-174, 1998.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Polysaccharides and Polyesters. In: \_\_\_\_\_. *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. New York : W. H. Freeman, 1995. p.265-272.
- GORIN, P.A.J. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. New York: Academic, 1980. v.38, p.13-97.
- GREASHAM, Randolph L.; HERBER, Wayne K. Design and optimization of growth media. In: RHODES, P. M.; STANBURY, P. F. *Applied Microbial Physiology*. Oxford: Oxford University, 1997. p.60.
- GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, Kidlington, v.281, p.143-154, 1996.
- IZELI, N.L. et al. Produção e caracterização química parcial dos exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *Botryosphaeria* sp. em diferentes fontes de carbono. In: FÓRUM DE CIÊNCIAS DA FCT, 4., Presidente Prudente, 2003. *Anais...* Presidente Prudente, 2003. v.1, p.35-39.
- KRCMAR, P. et al. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam, v.24, p.61-64, 1999.
- LEISOLA, M. et al. Polysaccharide synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* during degradation of kraft lignin. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.15, p.180-184, 1982.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia-Tecnologia das Fermentações*. São Paulo: Edgard Blucher, 1992. v.1, p.101-106.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of *Basidiomycetes* for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.30, p.77-84, 1999.

- MONTREUIL, J. et al. Glycoproteins. In: \_\_\_\_\_. *Carbohydrate Analysis: a Practical Approach*. Oxford: Approach, 1994. p.181-229.
- PAZUR, J.H. *Carbohydrate Analysis: a Practical Approach*. IRL. Oxford: Oxford-University Press, 1994. p.73-124.
- PIGATTO, M. M. Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ligninolítico *Botryosphaeria* sp. 2002. 53p. Monografia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- POLYCARPO, C. R. et al. Partial characterization of polysaccharides from *Fusarium solani*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.28, p.268-270, 1997.
- RICE, K.G.; CORRADI DA SILVA, M.L. Preparative purification of complex oligosaccharides, *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v.720, p.235-249, 1996.
- ROUKAS, T. and LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *Journal of Food and Engeneering*, Kidlington, v.40, p.89-94, 1999.
- SANTOS, A. et al. (1→6)-β -D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* Killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, Berlin, v.66, p.1809-1813, 2000.
- SCHMID, F. et al. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3; 1→6)-β-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Seglecht. *Carbohydrate Research*, Kidling, v.331, p.163-171, 2001.
- SCHUSTER, R.; WENZIG, E.; MERSMANN, A. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.39, p.155-158, 1993.
- SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glaucum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.34, p.51-55, 2002.
- SEVIOUR, R. J. et al. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, v.12, p.279-298, 1992.
- SILVA, I.R. et al. Alguns aspectos físico-químicos das glucanas produzidas pelo fungo *Botryosphaeria* sp. em diferentes fontes de carbono. FÓRUM DE CIÊNCIAS DA FCT, 4., Presidente Prudente, 2003. *Anais...* Presidente Prudente, 2003. v.1, p.30-34.
- SINHA, J. et al. Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.56, p.88-92, 2001.
- STASINOPOULOS, S. J.; SEVIOUR, R. J. and AUER, D. F. Inhibition of fungal exopolysaccharide production by chemical antifoams. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.8, p.91-93, 1989.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.
- VANHOOREN, P. T; VANDAMME, E. J. L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, London, v.74, p.479-497, 1999.
- WANG, Y.; MCNEIL, B. Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glaucum* in an airlift reactor with an external loop. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, London, v.63, p.215-222, 1995.
- WEST, T. P. Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253. *Journal of Basic Microbiology*, v.40, p.397-401, 2000.
- YANG, F-C.; LIAU, C-B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, kidlington, v.33, p.547-553, 1998.
- YURLOVA, N. A.; HOOG, G. S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.72, p.141-147, 1997.