



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DE DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DO  
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS  
EXTRACELULARES POR *Pleurotus* spp.**

**MARIANE BONATTI CHAVES**

**Florianópolis  
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Mariane Bonatti Chaves

**ESTUDO DE DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DO  
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS  
EXTRACELULARES POR *Pleurotus spp.***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra A. Furlan

Co-orientadora: Prof.a Dra. Regina M. M. Gern

Florianópolis

2011



**Estudo de Diferentes Formas de Condução do Processo de Produção  
de Polissacarídeos Extracelulares por *Plerotus* spp.**

Por

**Mariane Bonatti Chaves**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.  
**orientador**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Furlan  
**co-orientadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Miranda Gern  
**co-orientadora**

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
**coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Maísa Camellini

---

Prof. Dr. Ozair Souza

---

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

**Florianópolis, 22 de junho de 2011**



A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos laboratórios da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, em Joinville, SC.



Dedico este trabalho

Ao meu marido, minha filha,  
meus pais e minhas irmãs, pelo  
incentivo, amor e compreensão  
em todos os momentos.



## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Drs. Sandra A. Furlan, Regina M. M. Gern e Agenor Furigo Jr. pelo compromisso, dedicação e orientação deste trabalho,

Aos professores Drs. Aldo José Pinho Dillon, Ozair Souza, Carla Maísa Camelini, Márcio José Rossi e Hugo Moreira Soares, por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta tese,

A professora Dra. Elizabeth Wisbeck pelo apoio profissional e incentivo,

Aos alunos Nelson Libardi Jr, Karina Brodbeck, Carlos Alves Jr, Priscila Gislaine Rothers e Iveliza Simionato de Assis, pela dedicação e trabalho em conjunto realizado em laboratório,

A Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, pelo apoio técnico e financeiro,

A todas as pessoas que direta ou indiretamente apoiaram a realização deste trabalho.



## RESUMO

Fungos do gênero *Pleurotus* são reconhecidos por seu valor gastronômico, mas recentemente vêm recebendo especial atenção por suas propriedades terapêuticas, associadas à presença de polissacarídeos, em particular  $\beta$ -D-glucanos, presentes na parede celular e no caldo de cultivo destes fungos. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*. A primeira espécie foi cultivada em biorreator em processo descontínuo com pulsos de glicose e semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo, utilizando um biorreator de 4 L. Quando a concentração de glicose no meio de cultivo atingiu 20 – 25 g L<sup>-1</sup>, nos cultivos conduzidos em processo descontínuo com pulsos de glicose, adicionou-se ao biorreator solução concentrada de glicose a fim de elevar a concentração para 30 g L<sup>-1</sup>; nos cultivos conduzidos em processo semi-contínuo, 50 ou 75 % do volume de meio de cultivo foi retirado do biorreator e igual volume foi adicionado de meio de cultivo fresco, contendo glicose em quantidade suficiente para que a concentração desta retornasse a 40 g L<sup>-1</sup>. *P. sajor-caju* foi cultivado em processo descontínuo simples variando-se as concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja do meio de cultivo POL (experimentos realizados em frascos agitados), o valor de pH (pH 3,0, pH 4,0 e sem controle), CaCO<sub>3</sub> (com e sem adição de 1,0 g L<sup>-1</sup>) e concentração inicial de glicose (20 e 60 g L<sup>-1</sup>), utilizando biorreator de 4 L. Nos experimentos conduzidos em biorreator, valores de K<sub>1</sub>a de 15 h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C foram mantidos constantes. Nos experimentos conduzidos em processo descontínuo com pulsos de glicose, após 230 horas de cultivo obteve-se concentração máxima de EPS por *P. ostreatus* (0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo a produtividade máxima igual a 3,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Os experimentos conduzidos em processo semi-contínuo com corte de 50 % do volume de meio de cultivo, apresentaram menor produtividade em biomassa micelial (23,4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e maior produtividade em EPS (6,06 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) que os experimentos conduzidos com corte de 75 % (61,02 e 4,03 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente). Utilizando-se concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja, iguais a 2,5, 1,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, a concentração de EPS (0,60 g L<sup>-1</sup>) produzidos por *P. sajor-caju* aumentou 54 %. Quando ajustou-se o pH em 4,0 e adicionou-se CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) ao meio de cultivo, obteve-se aumento de 20 % da concentração de EPS (0,72 g L<sup>-1</sup>). Concentração inicial de glicose de 60

$\text{g L}^{-1}$  proporcionou aumento da concentração de EPS de 94,4 % ( 1,45  $\text{g L}^{-1}$ ), porém a produtividade foi 42,2 % menor que a obtida utilizando-se concentração inicial de glicose de 20  $\text{g L}^{-1}$ .

## ABSTRACT

*Pleurotus* genus is recognized for its gastronomic value, but in recent years it has received attention also for its therapeutic properties associated with polysaccharides,  $\beta$ -D-glucan in particular, present in the cell wall and in the culture broth. Therefore, this work was focused on extracellular polysaccharide (EPS) production, using *P. ostreatus* and *P. sajor-caju* species. The former was cultivated in fed batch culture and semi-continuous process with 50 and 75 % medium replacements, using 4 L bioreactor. When glucose concentration attained 20 - 25 g L<sup>-1</sup> in fed batch culture, bioreactor was fed with sufficient glucose solution to reach 30 g L<sup>-1</sup> and when residual glucose concentration reached 20 - 25 g L<sup>-1</sup> in semi-continuous culture, 50 or 75 % of the fermented broth was removed and replaced by fresh medium with sufficient glucose concentration to reach 40 g L<sup>-1</sup>. *P. sajor-caju* was cultivated in simple batch culture varying the (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, yeast extract and soy peptone initial concentrations in POL medium (using shake flasks), pH medium value (3.0, 4.0 and without control), calcium carbonate (without and with addition of 1.0 g L<sup>-1</sup>) and initial glucose concentration (20 and 60 g L<sup>-1</sup>), using 4 L bioreactor. In bioreactor assays, initial K<sub>L</sub>a was set to 15 h<sup>-1</sup> and temperature was kept constant at 30 °C. In fed batch culture, after about 230 hours of cultivation, maximum EPS concentration was obtained (0.8 g L<sup>-1</sup>) by *P. ostreatus*, with productivity being equal to 3.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. In semi-continuous culture, results obtained with 50 % medium replacement suggest a lower mean value of biomass productivity (23.4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) and a higher mean value of EPS productivity (6.06 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) than those obtained with 75 % medium replacement (61.02 and 4.03 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively). Using initial concentrations of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, yeast extract and soy peptone equal to 2.5, 1.0 and 1.0 g L<sup>-1</sup>, respectively, the EPS concentration (0.60 g L<sup>-1</sup>) was enhanced 54 % by *P. sajor-caju*. When the pH was adjusted to 4.0 and CaCO<sub>3</sub> (1.0 g L<sup>-1</sup>) was added to the culture medium, it was possible to enhance the EPS concentration by 20 % (0.72 g L<sup>-1</sup>). The initial glucose concentration equal to 60 g L<sup>-1</sup> enhanced the EPS concentration by 94.4 % (1.45 g L<sup>-1</sup>), but productivity was 42.2 % lower than that obtained using 20 g L<sup>-1</sup> of initial glucose concentration.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cogumelo do gênero <i>Pleurotus</i> na natureza. ....	31
Figura 2 - Ciclo de vida básico de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> . ....	32
Figura 3 - Ativação de diversas respostas imunológicas por polissacarídeos. Abreviações: IL = interleucina, IFN = interferon, TNF- $\alpha$ = fator de necrose tumoral alfa, M-CSF = fator estimulante de colônia de macrófagos, NO* = óxido nítrico. ....	35
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura molecular de (a) $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano, (b) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano, (c) $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano com ramificação $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e (d) complexo polissacarídeo peptídico/proteína (glicoproteína). ....	37
Figura 5 - Representação esquemática da conformação de $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos. ....	38
Figura 6 - Influência do pH sobre a morfologia do micélio de <i>Ganoderma lucidum</i> ; (A) cultivo sem controle do pH e (B) pH controlado em 6,0. ....	48
Figura 7 - Mudanças na morfologia do micélio em função das seguintes condições de cultivo (a) pH 6,0, vazão de ar 0,5 vvm, velocidade de agitação 100 rpm; (b) pH 4,0, vazão de ar 0,5 vvm, velocidade de agitação 250 rpm; (c) pH 5,0, vazão de ar 1,16 vvm, velocidade de agitação 166 rpm (condição otimizada). ....	52
Figura 8 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada, -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (horas) durante o cultivo de <i>P. ostreatus</i> em processo descontínuo com pulsos de glicose, em meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L <sup>-1</sup> , pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min <sup>-1</sup> (K <sub>L</sub> a inicial igual a 15 h <sup>-1</sup> ). ....	71
Figura 9 - Concentração de biomassa micelial em função do tempo (horas) durante o cultivo de <i>P. ostreatus</i> em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -□-) e 75 % (linha tracejada, -■-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L <sup>-1</sup> , pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min <sup>-1</sup> (K <sub>L</sub> a inicial igual a 15 h <sup>-1</sup> ). ....	75

Figura 10 - Concentração de glicose em função do tempo (horas) durante o cultivo de <i>P. ostreatus</i> em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -O-) e 75 % (linha tracejada, -●-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L <sup>-1</sup> , pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min <sup>-1</sup> (K <sub>1</sub> a inicial igual a 15 h <sup>-1</sup> ). .....	76
Figura 11 - Concentração de EPS em função do tempo (horas) durante o cultivo de <i>P. ostreatus</i> em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -Δ-) e 75 % (linha tracejada, -▲-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L <sup>-1</sup> , pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min <sup>-1</sup> (K <sub>1</sub> a inicial igual a 15 h <sup>-1</sup> ). .....	78
Figura 12 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada, -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (horas) durante o cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em processo descontínuo simples, em meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L <sup>-1</sup> , pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min <sup>-1</sup> (K <sub>1</sub> a inicial igual a 15 h <sup>-1</sup> ). .....	80
Figura 13 - Vista superior da cuba do biorreator ao final do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em processo descontínuo simples, evidenciando a formação de grandes aglomerados de biomassa micelial.....	81
Figura 14 - Efeito das interações entre as concentrações (g L <sup>-1</sup> ) das variáveis (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , extrato de levedura e peptona de soja, sobre a concentração (g L <sup>-1</sup> ) de EPS por <i>P. sajor-caju</i> .....	84
Figura 15 - Efeito das interações entre as concentrações (g L <sup>-1</sup> ) das variáveis (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , extrato de levedura e peptona de soja, sobre a concentração de biomassa (g L <sup>-1</sup> ) de <i>P. sajor-caju</i> .....	86
Figura 16 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -O-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -Δ-) em função do tempo (h) durante o cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em processo descontínuo, conduzidos em (a) pH 3,0, (b) pH 4,0 e (c) pH livre (evolução espontânea). A Figura 3c mostra também a variação do pH (linha pontilhada e tracejada, -◆-, -◇-) em função do tempo. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.....	91

Figura 17 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas..... 94

Figura 18 - Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup>, sem e com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>). As barras indicam a média ± desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores dos parâmetros cinéticos significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5 %.  $\Delta P_{\text{máx}}$  = variação da concentração de EPS entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{P/S}$  = fator de conversão de glicose em EPS, QP e  $QP_{\text{máx}}$  = produtividades, global e máxima, em EPS, respectivamente.  $\Delta X$  = variação da concentração de biomassa micelial entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de glicose em biomassa micelial, QX e  $QX_{\text{máx}}$  = produtividades, global e máxima, em biomassa micelial, respectivamente. .... 95

Figura 19 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), adição de 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> e concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup>. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas. .... 97

Figura 20 - Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) e concentrações iniciais de glicose de 20 e 60 g L<sup>-1</sup>. As barras indicam a média ± desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores dos parâmetros cinéticos significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5 %.  $\Delta P_{\text{máx}}$  = variação da concentração de EPS entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{P/S}$  = fator de conversão de glicose em EPS, QP e  $QP_{\text{máx}}$  = produtividades, global e máxima, em EPS, respectivamente.  $\Delta X$

= variação da concentração de biomassa micelial entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de glicose em biomassa micelial,  $QX$  e  $QX_{m\acute{a}x}$  = produtividades, global e máxima, em biomassa micelial, respectivamente. .... 99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial $2^3$ . Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada fator como inferior e superior, respectivamente.....	64
Tabela 2 - Concentrações iniciais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja de cada ensaio, definido através do planejamento fatorial $2^3$ (Tabela 1). .....	64
Tabela 3 - Fatores de conversão de glicose em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ), glicose em EPS ( $Y_{P/S}$ ), e produtividades globais em biomassa micelial (QX) e EPS (QP) obtidas dos cultivos conduzidos em processo semi-contínuo, com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo. ....	79
Tabela 4 - Efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial $2^3$ (Tabela 1), com nível mínimo de 95 % de confiança, para as concentrações de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ). ....	83
Tabela 5 - Efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial $2^3$ (Tabela 1), com nível mínimo de 95 % de confiança, para as concentrações de biomassa micelial ( $\text{g L}^{-1}$ ). ...	85



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

293T	linhagem de células de rim humano
4-AF	4-aminofenazona
CCB	Centro de Cultivo de Basidiomicetos da Universidade de São Paulo
DSM	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EPS	polissacarídeos extracelulares
GOD	glicose oxidase
Hela	linhagem de célula tumoral cervical
HL-60	linhagem de célula tumoral humana (leucemia promielocítica)
IFN	interferon
IL	interleucina
IPS	polissacarídeos intracelulares
$K_{L,a}$	coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )
M-CSF	fator estimulante de colônia de macrófagos
ms	massa seca
NK	linhagem de células natural killer
$P_0$	concentração de EPS no início do cultivo ( $g L^{-1}$ )
$P_{máx}$	concentração máxima de EPS obtida no cultivo ( $g L^{-1}$ )
$P_m$	concentração de EPS correspondente à $QP_{máx}$ ( $g L^{-1}$ )
POD	peroxidase
POL	meio de cultivo indicado por Cavazzoni e Adami (1992) para produção de polissacarídeos extracelulares por basidiomicetos
QP	produtividade global em EPS ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )
$QP_{máx}$	produtividade máxima em EPS ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )
QX	produtividade global em biomassa micelial ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )
$QX_{máx}$	produtividade máxima em biomassa micelial ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )
rpm	rotações por minuto
$S_0$	concentração de glicose no início do cultivo ( $g L^{-1}$ )
S	concentração de glicose correspondente à $P_{máx}$ ( $g L^{-1}$ )
TDA	meio de cultivo composto por extrato de trigo, dextrose e ágar
$t_E$	tempo de cultivo correspondente à $QP_{máx}$ (h)

TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
$t_p$	tempo de cultivo correspondente à $P_{\text{máx}}$ (h)
$t_x$	tempo de cultivo correspondente à $QX_{\text{máx}}$ (h)
vvm	volume de ar por volume de meio de cultivo por minuto
$X_0$	concentração de biomassa micelial no início do cultivo ( $\text{g L}^{-1}$ )
$X$	concentração de biomassa micelial correspondente à $P_{\text{máx}}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )
$X_m$	concentração de biomassa micelial correspondente à $QX_{\text{máx}}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	fator de conversão de glicose em EPS ( $\text{g g}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	fator de conversão de glicose em biomassa micelial ( $\text{g g}^{-1}$ )
$\Delta P_{\text{máx}}$	variação da concentração de EPS entre o início do cultivo e $t_p$ ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\Delta X$	variação da concentração de biomassa micelial entre o início do cultivo e $t_p$ ( $\text{g L}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
2.1 FUNGOS DO GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	31
2.2 AÇÃO MEDICINAL DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Pleurotus</i> ..	33
<b>2.2.1 Ação antitumoral</b> .....	<b>33</b>
2.3 POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	36
<b>2.3.1 Estrutura química</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.2 Influência da estrutura química sobre a ação                 medicinal</b> .....	<b>39</b>
2.4 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR BASIDIOMICETOS.....	40
<b>2.4.1 Composição do meio de cultivo</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4.2 Condições de cultivo: temperatura, pH, velocidade de                 agitação e vazão de ar</b> .....	<b>47</b>
<b>2.4.3 Propriedades reológicas dos meios de cultivo</b> .....	<b>50</b>
<b>2.4.4 Processos de cultivo</b> .....	<b>52</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRATÉGIA</b> .....	<b>57</b>
3.1 3.1. PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	57
<b>3.1.1 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> em processo                 descontínuo com pulsos de glicose</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1.2 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> em processo semi-                 contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio                 de cultivo</b> .....	<b>58</b>
3.2 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....	58
<b>3.2.1 Cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em processo                 descontínuo simples</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2.2 Determinação das concentrações iniciais de                 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja                 sobre a produção de biomassa micelial e EPS</b> .....	<b>59</b>

<b>3.2.3 Estudo da influência do pH, da adição de CaCO<sub>3</sub> e da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 MICRORGANISMOS.....	61
4.2 MEIOS DE CULTIVO .....	61
<b>4.2.1 Meio de manutenção .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.2 Meio de cultivo POL.....</b>	<b>61</b>
4.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	61
4.4 CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	62
<b>4.4.1 Cultivo de <i>P. ostreatus</i> em processos descontínuo com pulsos de glicose e semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4.2 Cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em processo descontínuo simples.....</b>	<b>63</b>
4.4.2.1 Determinação das concentrações iniciais de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , extrato de levedura e peptona de soja no meio de cultivo POL .....	63
4.4.2.2 Determinação do pH de cultivo, da adição de CaCO <sub>3</sub> e da concentração inicial de glicose no meio de cultivo .....	64
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	65
<b>4.5.1 Concentração de biomassa micelial .....</b>	<b>65</b>
<b>4.5.2 Concentração de glicose .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5.3 Extração e determinação da concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS) .....</b>	<b>66</b>
4.6 METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS .....	67
<b>4.6.1 Concentrações.....</b>	<b>67</b>
4.6.1.1 Variação da concentração de EPS.....	67
4.6.1.2 Variação da concentração de biomassa micelial .....	68
<b>4.6.2 Fatores de conversão .....</b>	<b>68</b>
4.6.2.1 Fator de conversão de glicose em biomassa micelial (Y <sub>X/S</sub> ).....	68
4.6.2.2 Fator de conversão de glicose em EPS (Y <sub>P/S</sub> ) .....	68
<b>4.6.3 Produtividades.....</b>	<b>68</b>

4.6.3.1	Produtividades globais em biomassa micelial (QX) e EPS (QP) .....	68
4.6.3.2	Produtividades máximas em biomassa micelial (QX <sub>máx</sub> ) e EPS (QP <sub>máx</sub> ) .....	69
<b>4.6.4</b>	<b>Velocidades de consumo de glicose e velocidades específicas máximas de crescimento .....</b>	<b>69</b>
4.7	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS CINÉTICAS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	69
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
5.1	PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	71
5.1.1	Cultivo em processo descontínuo com pulsos de glicose.....	71
5.1.2	Cultivo em processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo.....	74
5.2	PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....	79
5.2.1	Cultivo em processo descontínuo simples .....	79
5.2.2	Determinação das concentrações iniciais de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , extrato de levedura e peptona de soja.....	82
5.2.3	Determinação do pH de cultivo .....	89
5.2.4	Determinação da adição de CaCO <sub>3</sub> ao meio de cultivo ..	93
5.2.5	Determinação da concentração inicial de glicose no meio de cultivo .....	96
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE A - CURVAS CINÉTICAS REFERENTES AO CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> EM BIORREATOR – CULTIVOS 1 E 2. ....</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICE B - GRÁFICOS REFERENTES AO ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO CRESCIMENTO A PRODUÇÃO DE EPS POR <i>P. sajor-caju</i> EM PROCESSO DESCONTÍNUO SIMPLES. ....</b>	<b>127</b>



# 1. INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Pleurotus* vêm sendo estudados tanto devido às suas propriedades nutricionais e gastronômicas (MANZI *et al.*, 2001; RAGUNATHANA & SWAMINATHAN, 2003; MDACHI *et al.*, 2004; BONATTI *et al.*, 2004; TORO *et al.*, 2006) quanto, mais recentemente, às suas ações medicinais, como antioxidante (TSAI *et al.*, 2009; PALACIOS *et al.*, 2011), cardiovascular e redução do colesterol (SCHNEIDER *et al.*, 2011), analgésica (SUSEEM *et al.*, 2011) e antitumoral (SARANGI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; WOLFF, 2008; DALONSO *et al.*, 2010; ASSIS, 2011; TELLES *et al.*, 2011).

Dentre estas propriedades medicinais de *Pleurotus*, especial atenção tem sido dada à ação antitumoral, pois o câncer é uma doença que mata milhares de pessoas anualmente no mundo inteiro. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, estimativas para o ano de 2011 apontam para a ocorrência de mais de 489 mil novos casos de câncer no Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

Polissacarídeos produzidos por fungos do gênero *Pleurotus* podem ser obtidos tanto do corpo de frutificação, por meio do cultivo sólido, quanto da biomassa micelial e do meio de cultivo, obtidos por meio do cultivo líquido. Partindo-se do cultivo líquido, algumas vantagens são obtidas como maior controle das condições de cultivo, menor esforço e espaço para o cultivo, menor chance de contaminação, bem como menor custo para recuperação dos polissacarídeos (CUI & CHISTI, 2003). Neste tipo de cultivo, vários fatores merecem atenção a fim de se maximizar a produção de polissacarídeos, dentre os quais se destacam: composição do meio, pH, temperatura, vazão de ar, velocidade de agitação e forma de condução do processo produtivo (BARBOSA *et al.*, 2004).

Apesar de se encontrar vasta literatura sobre a ação medicinal de polissacarídeos produzidos por fungos do gênero *Pleurotus*, apenas poucos estudos têm sido encontrados em relação à influência do meio e das condições de cultivo sobre a produção de polissacarídeos extracelulares por esses fungos, dentre os quais pode-se citar Rosado *et al.* (2003), Wisbeck *et al.* (2005), Gern *et al.* (2008) e Borges (2009).

Diante deste contexto, o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos processos de cultivo descontínuo com pulsos de

glicose e semi-contínuo (com cortes de 50 e 75 %) sobre a produção de EPS por *P. ostreatus* e comparar os resultados com aqueles obtidos por Wisbeck *et al.* (2005), que utilizou o processo descontínuo simples. Em seguida, realizou-se o cultivo de *P. sajor-caju* em processo descontínuo simples, ou seja, naquele que levou à maior produção de EPS por *P. ostreatus*. A partir dos resultados obtidos deste cultivo, avaliou-se a influência das concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5,0 e 2,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) e peptona de soja (1,0 e 0,5 g L<sup>-1</sup>), constituintes do meio de cultivo POL (CAVAZZONI & ADAMI, 1992) sobre o crescimento de *P. sajor-caju* e sobre a produção de EPS. Foram avaliadas também as influências do pH (pH 3,0, pH 4,0 e pH não-controlado), da adição de  $\text{CaCO}_3$  (1,0 g L<sup>-1</sup>) e da concentração inicial de glicose (20 e 60 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultivo sobre a produção de células e EPS por *P. sajor-caju*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus*

*Pleurotus* spp. são comumente denominados cogumelos ostra devido ao seu formato (Figura 1), mas também podem ser chamados de hiratake, shimeji ou caetetuba (RANZANI & STURION, 1998).



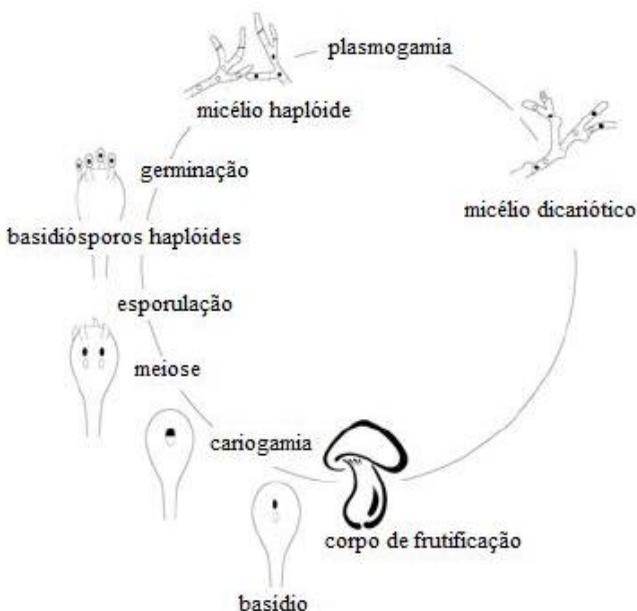
**Figura 1 - Cogumelo do gênero *Pleurotus* na natureza.**

Fonte: Disponível na internet. <http://mushroom-collecting.com/mushroomoyster.html>. Acesso em: 18 de maio 2011.

*Pleurotus* é um fungo saprófita, ou seja, é decompositor primário de diversos materiais lignocelulósicos devido à segregação de diversas enzimas por filamentos celulares microscópicos denominados hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio, que é responsável pelas funções da fase vegetativa do organismo (TRABULSI *et al.*, 1999; PUTZKE e PUTZKE, 2002). Pode ser encontrado naturalmente em florestas temperadas, tropicais e subtropicais, podendo também ser cultivado artificialmente em meio sólido (ZADRAZIL & KURTZMAN, 1984; BONONI & TRUFEM, 1995; SANTOS, 2000; BONATTI, 2001; SÁNCHEZ, 2009; MOONMOON *et al.*, 2010; SHER *et al.*, 2010; ARORA *et al.*, 2011) e líquido (MAZIERO *et al.*, 1999; WISBECK *et al.*, 2005; GERN, 2005; CASTRO *et al.*, 2007; CONFORTIN *et al.*,

2008). Apreciado por seu sabor, este cogumelo não somente contém alta quantidade de proteínas e carboidratos, como minerais (cálcio, fósforo, ferro etc.) e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina) (MANZI *et al.*, 2001; RAGUNATHANA & SWAMINATHAN, 2003; MDACHI *et al.*, 2004; MANZI *et al.*, 2004; BONATTI *et al.*, 2004; TORO *et al.*, 2006; GHORAI *et al.*, 2009).

Esse gênero pertence ao grupo dos basidiomicetos, dos quais existem mais de 25 mil espécies conhecidas. Distinguem-se dos demais grupos por possuírem basídio, uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia e a meiose. Cada basídio produz quatro basidiósporos haplóides, resultado de uma meiose. Basidiósporos haplóides germinam para formar micélios haplóides que se unem para formar um micélio dicariótico. O micélio dicariótico desenvolve-se pela divisão simultânea de dois núcleos e a formação de um novo septo. O micélio dicariótico, em seguida, diferencia-se em basidiocarpo (corpo de frutificação que produz basídio) dando origem aos basidiósporos e então, o ciclo se reinicia (Figura 2) (RAVEM *et al.*, 2001).



**Figura 2 - Ciclo de vida básico de fungos do gênero *Pleurotus*.**

Fonte: KANG (2004).

## 2.2 AÇÃO MEDICINAL DE FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus*

Várias ações medicinais têm sido atribuídas aos fungos do gênero *Pleurotus*, por exemplo, ação antioxidante (JAYAKUMAR *et al.*, 2009; WONG & CHYE, 2009; TSAI *et al.*, 2009; PALACIOS *et al.*, 2011), cardiovascular e redução do colesterol (BOBEK *et al.*, 1996; SCHNEIDER *et al.*, 2011), antiinflamatória e analgésica (SMIDERLE *et al.*, 2008; SUSEEM *et al.*, 2011), antiviral (ZHANG *et al.*, 2004a), antimicrobiana (WISBECK *et al.*, 2002; WOLFF, 2008; HEARST *et al.*, 2009) e antitumoral (WANG *et al.*, 2000; LAVI *et al.*, 2006; SARANGI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2007; WOLFF, 2008; MAITI *et al.*, 2008; TONG *et al.*, 2009; SUN & LIU, 2009; ASSIS, 2011; TELLES *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Dentre essas, merece atenção especial o estudo da ação antitumoral promovida por polissacarídeos extraídos tanto dos corpos de frutificação de *Pleurotus*, quanto da biomassa micelial e do meio de cultivo, pois o câncer é uma doença que mata, anualmente, milhares de pessoas no mundo inteiro (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

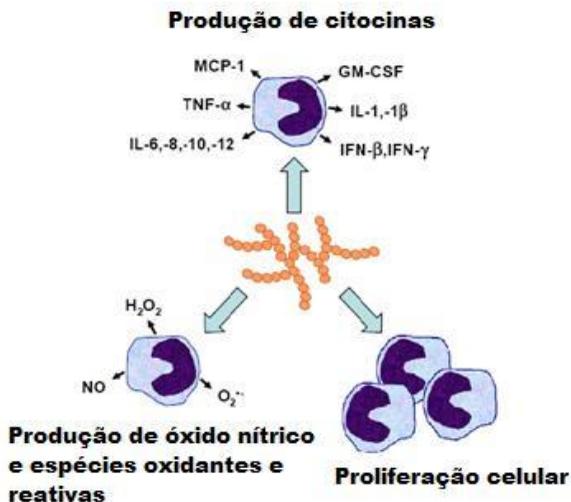
### 2.2.1 Ação antitumoral

Estima-se para o ano de 2011 a ocorrência de mais de 489 mil novos casos de câncer no Brasil. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização mostra-se heterogênea entre estados e capitais do país. As regiões sul e sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas; enquanto as regiões norte e nordeste, as menores.

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

Neste contexto, polissacarídeos produzidos por fungos do gênero *Pleurotus* têm grande importância, pois possuem capacidade de aumentar a resposta imunológica dos organismos devido à síntese de compostos imunomoduladores, os quais têm capacidade de inibir a proliferação de diferentes células tumorais em testes realizados tanto *in vitro* (LAVI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2007; TONG *et al.*, 2009; SUN & LIU, 2009; TELLES *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011) quanto *in vivo* (MIZUNO, 1999; WANG *et al.*, 2000; MAITI *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2009).

A ação desses polissacarídeos se dá principalmente através da ativação de macrófagos (células fagocíticas) importantes tanto na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, como também em uma variedade de respostas imunológicas e inflamatórias, incluindo produção de antígenos, regulação de resposta dos linfócitos, produção de citocinas, proliferação celular e reparo tecidual, além de atividade citotóxica indireta e produção de espécies oxidantes reativas como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{*-}$  e óxido nítrico (Figura 3). Macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para polissacarídeos produzidos por fungos. Desta forma, estas células podem reconhecer e fagocitar estes polissacarídeos, que provocam a ativação destes macrófagos, que levará conseqüentemente a produção e secreção de IL-1, IL-6,  $TNF\alpha$ ,  $O_2^{*-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^*$ , bem como aumento da capacidade fagocítica da célula (BOHN & BEMILLER, 1995; SCHEPETKIN & QUINN, 2006; CHEN & SEVIOUR, 2007; MORADALI *et al.*, 2007; PÉREZ-GUISADO, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; BORCHERS *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2008; FUKUDA *et al.*, 2009).



**Figura 3 - Ativação de diversas respostas imunológicas por polissacarídeos.** Abreviações: IL = interleucina, IFN = interferon, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa, M-CSF = fator estimulante de colônia de macrófagos, NO\* = óxido nítrico.

Fonte: SCHEPETKIN & QUINN (2006).

Polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação *Pleurotus ostreatus* por Wang *et al.* (2000) apresentaram ação antitumoral *in vivo* contra células de Sarcoma 180 (inibição de 88,46 %) e de Hepatoma 22 (inibição de 75,42 %). Sarangi *et al.* (2006) comprovaram o efeito imunomodulatório e antitumoral de polissacarídeos extraídos da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus* através de testes *in vitro* e *in vivo*. A substância isolada foi capaz de diminuir o número de células do Sarcoma 180 (48,34 %, 76,94 % e 63,72 % para as frações I, II e II, respectivamente), bem como de aumentar o número de células natural killer (NK) e de macrófagos. Wolff *et al.* (2008) avaliaram a ação antitumoral do caldo de cultivo *in natura* de *Pleurotus ostreatus*, bem como dos polissacarídeos extraídos deste caldo e de corpos de frutificação. A maior taxa de inibição (76 %) contra células do tumor ascítico de Ehrlich foi obtida com os polissacarídeos extraídos do caldo de cultivo. Polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* apresentaram ação altamente citotóxica para células do tumor Hela (concentrações variando de 200 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentaram redução de mais de 60 % das células tumorais) e baixíssima toxicidade para células de rim humano 293T (inibição

inferior a 20 % para concentrações variando de 50 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (TONG *et al.*, 2009); bem como induziram a proliferação de linfócitos (células de defesa do organismo) em testes *in vitro* (SUN & LIU, 2009), sugerindo o uso destes polissacarídeos como potenciais agentes imunestimuladores e como drogas antitumorais.

Polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação e da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida* mediarão a ação antiproliferativa de várias linhagens de células tumorais devido a indução da apoptose destas células, bem como aumentaram a citotoxicidade de células natural killer (NK) em camundongos e estimularam macrófagos a produzir óxido nítrico (MAITI *et al.*, 2008).

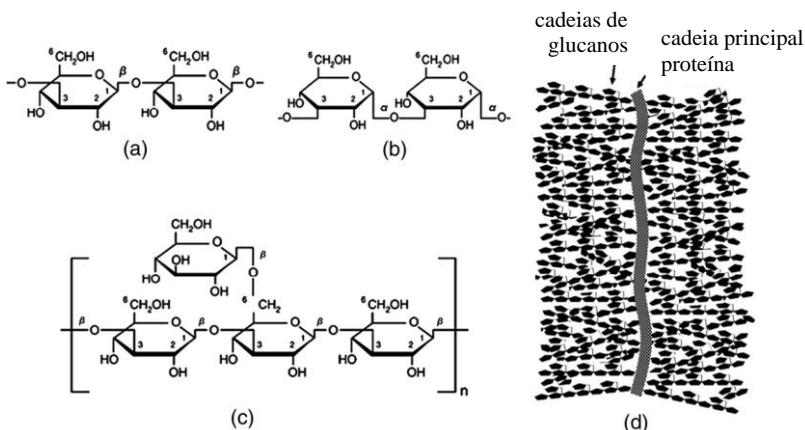
Mizuno (1999) e Dalonso *et al.* (2009) avaliaram a atividade antitumoral de polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*. O primeiro autor observou, após aproximadamente seis semanas, redução de 100 % das células de Sarcoma 180, transplantadas em camundongos. Os segundos autores observaram redução de aproximadamente 85,5 % no número de células neoplásicas (de tumor ascítico de Ehrlich), inoculadas em camundongos. Telles *et al.* (2011) realizaram a sulfatação de polissacarídeos extracelulares produzidos por *Pleurotus sajor-caju*, de acordo com metodologia proposta por Wolff *et al.* (2008), e observaram inibição de 60% no número de células do tumor Hela quando na concentração de 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ , em testes *in vitro*.

## 2.3 POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus*

### 2.3.1 Estrutura química

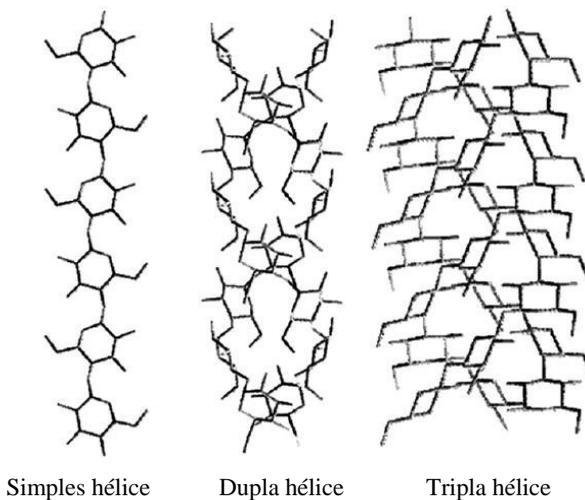
Polissacarídeos são polímeros constituídos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas diferindo entre si na unidade e no grau de ramificação, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias, apresentando diferentes composições e funções, sendo classificados como homopolímeros ou heteropolímeros. Os glucanos (Figura 4 a-c) são os homopolissacarídeos mais comuns produzidos por fungos, sendo a maioria linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). Os  $\beta$ -glucanos são a forma predominante, podendo estar livres ou associados a vários outros componentes químicos como nos lipídeos, formando os lipopolissacarídeos, ou nas proteínas, formando as glicoproteínas e os proteoglicanos. Glicoproteínas (Figura 4d) são

associações covalentes de oligossacarídeos ou polissacarídeos de baixa massa molecular a proteínas, sendo a cadeia principal da molécula constituída de proteína. Os proteoglicanos, que possuem propriedades lubrificantes e promovem alta viscosidade a algumas secreções extracelulares, têm cadeia principal constituída de glucanos e ligada à proteínas. A conformação destas moléculas pode variar desde simples até tripla hélice, que é a forma mais comum, onde três cadeias de polímeros são agregadas por ligações de hidrogênio aos átomos de oxigênio do C-2 (Figura 5) (SILVA *et al.*, 2006; MORADALI *et al.*, 2007; SANTOS-NEVES, 2008; FUKUDA *et al.*, 2009).



**Figura 4 - Representação esquemática da estrutura molecular de (a)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano, (b)  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano, (c)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano com ramificação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e (d) complexo polissacarídeo peptídeo/proteína (glicoproteína).**

Fonte: MORADALI *et al.* (2007).



**Figura 5 - Representação esquemática da conformação de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos.**

Fontes: MORADALI *et al.* (2007).

A função específica dos  $\beta$ -glucanos na fisiologia do fungo não está completamente esclarecida. Entretanto, considera-se que sua principal função estrutural seja auxiliar na manutenção da rigidez e na integridade da parede celular. Tem sido sugerido que os glucanos extracelulares de fungos lignocelulolíticos desempenham um importante papel na degradação da lignina, como fonte indireta de peróxido de hidrogênio. Outra participação destes polissacarídeos extracelulares no metabolismo do fungo, em particular daqueles que degradam a madeira, seria a de atuar como um suporte para adsorção das enzimas excretadas e, finalmente, acredita-se que os polissacarídeos extracelulares protegeriam a hifa da desidratação, bem como regulariam a concentração de glicose extracelular (SILVA *et al.*, 2006).

Como exemplo trivial de  $\beta$ -glucanos pode-se citar a celulose e como principais fontes alimentícias de  $\beta$ -glucanos, os vegetais, as fibras solúveis dos cereais integrais e os fungos. A inclusão destas moléculas na alimentação é recomendável já que várias ações medicinais como antiviral, antiinflamatória, antitumoral, redução do colesterol são atribuídas a estas moléculas (PÉREZ-GUISADO, 2007).

Manzi *et al.* (2001) estudaram a presença de polissacarídeos do tipo  $\beta$ -glucanos em diferentes espécies de cogumelos: *Pleurotus*

*ostreatus* (SMR 125, SMR 127, SMR 138), *Pleurotus pulmonarius* (SMR 126), *Pleurotus eryngii* (SMR 172, SMR 173, SMR 133) e *Lentinula edodes* (SMR 90). A concentração variou de 0,22 g/100 g de massa seca de *Pleurotus eryngii* SMR 172 e *Lentinula edodes* SMR 90 a 0,53 g/100 g em *Pleurotus pulmonarius* SMR 126. Em relação à distribuição desses polissacarídeos, preferencialmente no conteúdo de fibra solúvel (a qual teria, devido a sua maior solubilidade, maior ação terapêutica) ou no conteúdo de fibra insolúvel, o autor observou maior concentração de  $\beta$ -glucanos na fração insolúvel da fibra. O cogumelo que apresentou maior porcentagem de  $\beta$ -glucanos na fração insolúvel foi *Pleurotus eryngii* SMR 172 (83,2 %) e aquele que apresentou maior concentração de  $\beta$ -glucanos na fração solúvel foi *Lentinula edodes* (46 %).

### 2.3.2 Influência da estrutura química sobre a ação medicinal

As ações medicinais dos polissacarídeos parecem estar relacionadas à estrutura química e a conformação espacial destas moléculas, sendo que pequenas diferenças estruturais entre elas resultam em características peculiares para novas ações (BOHN & BEMILLER, 1995; SILVA *et al.*, 2006). Pérez-Guisado (2007) atribuiu as diferentes ações medicinais de diversos basidiomicetos principalmente à massa molecular e ao número de ramificações presentes nos polissacarídeos (do tipo  $\beta$ -glucanos) produzidos por esses fungos. Yang e Zhang (2009) atribuíram diversas ações medicinais de basidiomicetos como *Pleurotus tuber-regium*, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia auricular* e *Lentinula edodes* à estrutura química e à conformação da cadeia dos polissacarídeos encontrados nestas espécies.

A estrutura química parece influenciar não só no tipo de ação medicinal, mas também na sua intensidade da ação, conforme pode ser observado no trabalho de Tao *et al.* (2006). Os autores isolaram oito frações (denominadas F1 a F8) de um  $\beta$ -glucano ramificado, solúvel em água, extraído do esclerócio de *Pleurotus tuber-regium*, dentre as quais cinco foram sulfatadas e denominadas S-F2, S-F3, S-F4, S-F5 e S-F8. As frações sulfatadas apresentaram ação antitumoral *in vivo* e *in vitro* contra células de Sarcoma 180 implantadas em camundongos e contra células do tumor de fígado HepG2, respectivamente, relativamente mais alta que as frações de origem. O aumento da solubilidade em água e a modificação da conformação da cadeia dos polissacarídeos sulfatados foram os principais fatores que contribuíram para o aumento da ação antitumoral. O maior obstáculo da utilização clínica de  $\beta$ -glucanos é a

relativa falta de solubilidade em meio aquoso. As quatro frações, F2, F3, F4 e F5, que apresentaram maior massa molar, apresentaram também maior porcentagem de inibição. As frações 3 e 5 apresentaram maior atividade que o agente antitumoral 5-Fu, comercialmente conhecido.

Tao *et al.* (2009) extraíram de *Pleurotus tuber-regium* duas glicoproteínas, solúveis em água, e as modificaram quimicamente obtendo seus derivados sulfatados e carboximetilados. Tanto as formas *nativas* quanto as modificadas quimicamente apresentaram conformação esférica, porém as glicoproteínas modificadas apresentaram maior ação antitumoral *in vitro*, reforçando a importância do aumento da solubilidade da molécula e a introdução de grupos iônicos para a ação antitumoral. Jung *et al.* (2011) investigaram a ação antitumoral de polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação de *Pleurotus eryngii* após a sulfatação desses. Os autores observaram aumento da ação antitumoral contra células de câncer de pulmão A549, sendo a ação similar àquela obtida com o agente antitumoral 5-Fu.

O método de extração também pode influenciar o tipo de polissacarídeo obtido. Dependendo do método pode-se obter polissacarídeos de diferentes estruturas e com diferentes intensidades de ação medicinal. Por exemplo, Zhang *et al.* (2004b) extraíram do esclerócio e do micélio de *Pleurotus tuber-regium* quatro polissacarídeos utilizando a técnica de extração com água quente e quatro utilizando a ultrasonificação. Os polissacarídeos extraídos tanto do esclerócio quanto do micélio com água quente apresentaram maior ação antitumoral *in vivo* contra células de Sarcoma 180 implantadas em camundongos, bem como maior ação antitumoral *in vitro* contra leucemia de células promielocíticas HL-60 que aqueles extraídos mediante a técnica de ultrasonificação. Dentre as frações obtidas àquelas carboximetiladas apresentaram maior solubilidade, bem como maior ação antitumoral. As moléculas modificadas aumentaram a produção de citocinas do tipo TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) no plasma de camundongos.

## 2.4 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR BASIDIOMICETOS

Polissacarídeos extracelulares (EPS) são uma classe de biopolímeros que apresentam alto valor agregado e grande diversidade de aplicações industriais como espessantes, geleificantes, emulsificantes, auxiliar na ação de enzimas extracelulares para a degradação de compostos xenobióticos, etc. (BARBOSA *et al.*, 2004;

PAPAGIANNI, 2004; GHORAI *et al.*, 2009). Muitos tipos de EPS têm sido produzidos por meio do cultivo submerso de basidiomicetos ou fungos entomopatogênicos para uso medicinal (LOMBERH *et al.*, 2002; LINDEQUIST *et al.*, 2005; SCHEPETKIN & QUINN, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; CHEN & SEVIOUR, 2007; FUKUDA, *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2009; FENG *et al.*, 2010; PAPINUTTI, 2010). Maziero *et al.* (1999) realizaram uma seleção dentre 56 espécies de fungos isolados de diferentes ecossistemas brasileiros para a produção de EPS e biomassa micelial em cultivo submerso. *Agaricus* sp. (CCB 280) e *Oudemansiella canarii* (Jungh) Hohn (CCB 179) foram os maiores produtores de EPS (6,01 e 3,54 g L<sup>-1</sup>, em massa seca (ms), respectivamente), após 7 dias de cultivo. Espécies do gênero *Pleurotus* como *P. flabellatus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus*, *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* variedade *florida* produziram 0,81, 0,57, 2,20, 1,85 e 2,85 g ms L<sup>-1</sup>, respectivamente, após 7 dias de cultivo. O maior produtor de biomassa micelial foi *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (CCB 473) com 16,68 g ms L<sup>-1</sup>, após 14 dias de cultivo. Dentre as espécies comestíveis, os que produziram maior concentração de biomassa micelial, após 7 dias de cultivo, foram *Pleurotus sajor-caju* (11,47 g ms L<sup>-1</sup>), *P. sp. florida* (11,02 g ms L<sup>-1</sup>) e *Agrocybe platensis* (10,18 g ms L<sup>-1</sup>). Durante os cultivos, não foram observadas relações constantes entre as concentrações de biomassa micelial e EPS.

De acordo com Barbosa *et al.* (2004), tanto o crescimento celular dos fungos quanto a produção específica do tipo de EPS podem ser influenciadas por uma série de variáveis inerentes ao processo de cultivo empregado: composição do meio de cultivo, temperatura, pH, velocidade de agitação, vazão de ar, viscosidade do meio de cultivo, morfologia do fungo etc.

#### 2.4.1 Composição do meio de cultivo

Um dos componentes mais importantes a ser definido é o tipo da fonte de carbono e a sua concentração. Várias são as fontes de carbono estudadas para a produção de biomassa micelial e EPS por fungos: glicose, sacarose, maltose, lactose, frutose, galactose, xilose, celobiose, sorbitol, xilitol, manitol, arabinose, inositol etc. A fonte de carbono mais utilizada é a glicose, com concentração variando de 20 a 60 g L<sup>-1</sup>. A escolha da fonte de nitrogênio também é muito importante e influencia diretamente a produção de biomassa micelial e EPS. As fontes orgânicas mais utilizadas são: peptona, glutamato, L-asparagina, extrato de levedura, succinato de amônio etc. Entre as inorgânicas pode-se citar:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  etc. (BARBOSA *et al.*, 2004; PAPAGIANNI, 2004).

A definição dos microelementos constituintes do meio de cultivo é também muito importante devido à presença desses na composição de muitas enzimas, vitaminas, proteínas, nucleotídeos etc., essenciais para o desenvolvimento de qualquer organismo. Os microelementos mais utilizados são:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , entre outros. Normalmente, fosfatos e sulfatos são requeridos em maiores concentrações pelos microrganismos em comparação com os outros sais inorgânicos. O fosfato é um dos constituintes dos fosfolípidos e ácidos nucleicos e é também regulador de certas enzimas dos metabolismos primário e secundário. Sulfato é necessário para a biossíntese de aminoácidos sulfurados e metabólitos secundários, como por exemplo, os antibióticos (GRESHAM & HERBER, 1997 citado por BARBOSA *et al.*, 2004; PAPAGIANNI, 2004).

Luo *et al.* (2009), estudaram uma forma de maximizar a produção de biomassa e EPS por *Phellinus baumii* Pilát. Para tanto utilizaram um planejamento fatorial  $2^{(7-3)}$ , cujos resultados determinaram que os componentes que influenciaram significativamente no crescimento celular e produção de EPS por *Phellinus baumii* foram a glicose, extrato de levedura e oxalato de amônio monohidratado.

Papinutti (2010) avaliou a produção de EPS por *Ganoderma lucidum* utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, lactose, celulose, extrato de malte, asparagina e peptona) concluíram que a glicose e a celulose propiciaram a maior concentração de EPS (139,01  $\text{mg g}^{-1}$ ).

Chen *et al.* (2008) estudaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de biomassa micelial e de EPS pelo cogumelo medicinal *Fomes fomentarius*. Das dez fontes de carbono avaliadas (glicose, maltose, sacarose, lactose, frutose, galactose, manitol, xilose, amido solúvel e extrato de malte), as maiores concentrações de biomassa micelial (7,48  $\text{g L}^{-1}$ ) e EPS (0,81  $\text{g L}^{-1}$ ) foram obtidas com glicose.

Cho *et al.* (2006), dentre as diferentes fontes de carbono estudadas (glicose, maltose, frutose, sacarose, lactose, manitol, sorbitol e xilose), também obtiveram maior produção de biomassa e EPS por *Tremella fuciformis* quando utilizaram glicose como fonte de carbono, independentemente das concentrações dos carboidratos avaliados. O mesmo resultado foi obtido para as sete fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, maltose, lactose, sorbitol e xilose) avaliadas por

Pokhrel e Ohga (2007) para produção de biomassa ( $6,36 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $1,65 \text{ g L}^{-1}$ ) por *Lyophyllum decastes*. Experimentos realizados por Lee *et al.* (2004) também mostraram ser a glicose a fonte de carbono preferencialmente utilizada por *Grifola frondosa* para crescimento e produção de EPS ao invés de amido, sacarose, maltose e galactose. Assim como, Burns *et al.* (1994) observaram preferência de *Pleurotus* variedade *florida* por glicose ao invés de sacarose, galactose, lactose e xilose para produção de EPS ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

Entretanto, de acordo com o gênero e até mesmo com a espécie de basideomiceto, comportamento diferente pode ser observado. O fungo pode utilizar um tipo de fonte de carbono para produção de biomassa micelial e outro para a produção de EPS. Confortin *et al.* (2008) obtiveram maior concentração de biomassa micelial ( $8,18 \text{ g L}^{-1}$ ) quando utilizaram glicose no meio de cultivo, bem como maior rendimento ( $0,82 \text{ g g}^{-1}$ ) e produtividade em biomassa micelial ( $0,085 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Entretanto, sacarose propiciou maior concentração de EPS ( $1,58 \text{ g ms L}^{-1}$ ) do que glicose ( $1,18 \text{ g ms L}^{-1}$ ). Zou (2006) estudou o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de biomassa micelial e de dois metabólitos de interesse medicinal, ergosterol e EPS, por *Agaricus brasiliensis*. Enquanto glicose propiciou maior densidade celular ( $12,3 \text{ g L}^{-1}$ ), sacarose propiciou maior concentração ( $1,6 \text{ g L}^{-1}$ ) e produtividade ( $222,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) em EPS. Shih *et al.* (2006) também obtiveram maior concentração de biomassa ( $8,7 \text{ g L}^{-1}$ ) por *Antrodia cinnamomea* utilizando glicose como fonte de carbono e maior concentração de EPS ( $1,32 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizando sacarose.

Além do tipo de fonte de carbono, a definição de sua concentração é importante para maximização da produção de biomassa micelial e EPS por fungos. Geralmente, aumentando-se a concentração da fonte de carbono maiores concentrações de biomassa e EPS podem ser obtidas. Huang e Liu (2008) e Shih *et al.* (2008) avaliaram a influência da concentração de glicose sobre a produção de biomassa e EPS por *Grifola umbellata* e *Grifola frondosa*, respectivamente. Ambos os grupos de pesquisadores obtiveram maior concentração de biomassa micelial e EPS utilizando maiores concentrações de glicose. Quando a concentração de glicose foi aumentada de 2 para 4%, o cultivo de *Grifola frondosa* propiciou a produção do dobro de EPS. Wisbeck *et al.* (2005), também obtiveram maior concentração de biomassa e EPS ( $12,8$  e  $1,33 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) por *Pleurotus ostreatus* quando utilizaram concentração inicial de glicose igual a  $40 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Assim como Rosado *et al.* (2003) obtiveram maior concentração de EPS

(9,7 g L<sup>-1</sup>) por *Pleurotus ostreatoroseus* com a maior concentração de glicose, ou seja, 60 g L<sup>-1</sup> ao invés de 30 g L<sup>-1</sup>.

Em todos esses trabalhos, o aumento da concentração de glicose proporcionou incremento na concentração celular e de EPS. Entretanto, este comportamento não pode ser generalizado conforme demonstrado por Libardi-Jr *et al.* (2007). Ao avaliarem a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju*, em experimentos realizados em frascos agitados, obtiveram as maiores concentrações de EPS e biomassa micelial (1,16 e 18,37 g L<sup>-1</sup>) utilizando concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> ou 80 g L<sup>-1</sup>.

Com relação à influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de biomassa micelial e EPS por fungos, geralmente fontes orgânicas de nitrogênio têm favorecido a produção de biomassa micelial e EPS, pois aminoácidos essenciais dificilmente são produzidos através de fontes inorgânicas de nitrogênio. Dentre as fontes de nitrogênio testadas por Chen *et al.* (2008) (NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, uréia, L-lisina, ácido L-aspártico, peptona, triptona, extrato de carne e farelo de casulo do bicho da seda), farelo de casulo do bicho da seda produziu maior concentração de biomassa (8,16 g L<sup>-1</sup>) e de EPS (0,89 g L<sup>-1</sup>) por *Fomes fomentarius*. Huang e Liu (2008), obtiveram o rendimento em EPS (112,35 mg g<sup>-1</sup>), produzidos por *Fomes fomentarius*, aumentado 4,36 vezes quando utilizaram leite desnatado (skim milk) como fonte de nitrogênio. Xiao *et al.* (2006) estudaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de EPS por *Cordyceps jiangxiensis*. Dentre as fontes de nitrogênio avaliadas (NaNO<sub>3</sub>, peptona, extrato de carne, farelo de soja, farelo de milho e farelo de castanha) as orgânicas se mostraram melhores para produção tanto de biomassa micelial quanto de EPS, sendo o farelo de castanha na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>, aquela que propiciou as suas maiores concentrações (16,73 e 5,84 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Esses autores associaram esse resultado à presença de aminoácidos essenciais nas fontes orgânicas de nitrogênio, que são absorvidos e biosintetizados diretamente, o que não acontece se a fonte de nitrogênio for inorgânica. Hwang *et al.* (2003), também obtiveram maior concentração de biomassa e EPS por *Phellinus linteus* quando utilizaram fontes orgânicas de nitrogênio. Dentre as fontes avaliadas (farelo de milho, extrato de malte, peptona de carne, polipeptona, peptona de soja, triptona, extrato de levedura, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> e NaNO<sub>3</sub>), farelo de trigo proporcionou as maiores concentrações de biomassa micelial (5,72 g L<sup>-1</sup>) e EPS (1,97 g L<sup>-1</sup>). As maiores concentrações de biomassa

(12,5 g L<sup>-1</sup>) e EPS (1,861 mg L<sup>-1</sup>) por *Antrodia cinnamomea* CCRC36716 foram obtidas utilizando quaisquer das seguintes fontes orgânicas de nitrogênio: milhocina, extrato de levedura ou extrato de malte foram utilizadas (SHIH *et al.*, 2006). Extrato de levedura propiciou a maior concentração de EPS (0,2 g L<sup>-1</sup>) por *Agaricus brasiliensis* (FAN *et al.*, 2007) e por *Lyophyllum decastes* (1,76 g L<sup>-1</sup>), um cogumelo de valor gastronômico e medicinal (POKHREL e OHGA, 2007). Lee *et al.* (2004) também observaram preferência por extrato de levedura para crescimento e produção de EPS por *Grifola frondosa* ao invés de NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, peptona de carne e polipeptona.

Burns *et al.* (1994) e Gern *et al.* (2008) observaram influência negativa de fontes inorgânicas de nitrogênio sobre a produção de biomassa e EPS por *Pleurotus* variedade *florida* e *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. O primeiro grupo de pesquisadores, em cultivo limitado em nitrogênio (0,1 g L<sup>-1</sup> de tartarato de amônio) obteve maior concentração de EPS (0,5 g L<sup>-1</sup>). Gern *et al.* (2008), quando avaliaram a influência de três fontes de nitrogênio (extrato de levedura, milhocina e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sobre a produção de biomassa e EPS por *Pleurotus ostreatus*, observaram maior produtividade em polissacarídeos (20,05 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) quando utilizou-se 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e ausência de fonte de nitrogênio inorgânica. Quando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi utilizado, baixos valores de concentração máxima de biomassa micelial e de produtividade máxima em biomassa micelial (1,69 g L<sup>-1</sup> e 0,25 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente) foram obtidos, na ausência de fonte de nitrogênio orgânica. Além disso, quando estes resultados são comparados com aqueles obtidos com um meio contendo somente extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (10,58 g L<sup>-1</sup> e 1,48 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) pode-se notar que a concentração máxima de biomassa micelial é seis vezes maior, mostrando a inibição do crescimento de *Pleurotus ostreatus* por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rosado *et al.* (2003) obtiveram maior concentração de EPS (9,7 g L<sup>-1</sup>) por *Pleurotus ostreatoroseus* quando utilizaram menor concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Confortin *et al.* (2008) observaram a influência negativa de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju* PS2001 avaliando a influência da concentração de três fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona de soja e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). De acordo com o planejamento fatorial realizado, menores concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e extrato de levedura, bem como maiores concentrações de peptona de soja no meio de cultivo, proporcionaram aumento da produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju* PS2001 (1,18 g L<sup>-1</sup>).

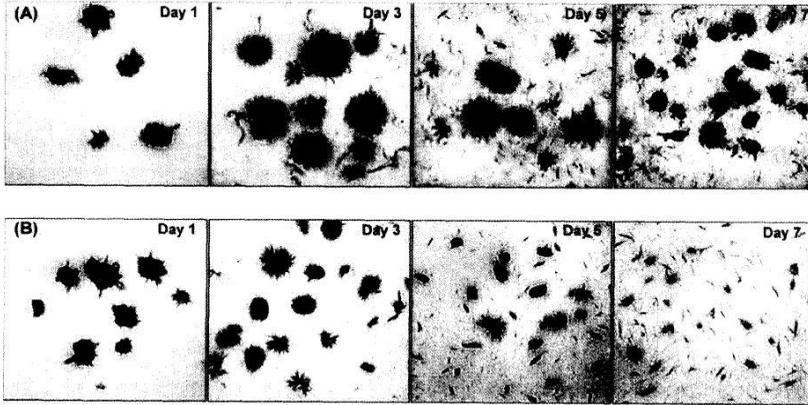
Dentre os elementos minerais, o cálcio é citado por alguns autores como indutor da produção de biomassa e de metabólitos secundários, como polissacarídeos, por fungos, pois está envolvido em diversos processos bioquímicos do metabolismo de fungos. Apesar de não ter sido demonstrado que todos os fungos o utilizam, ele está relacionado a muitos aspectos importantes da estrutura celular, principalmente por ser responsável pela manutenção da integridade estrutural da membrana e na produção de enzimas. Em basidiomicetos, o cálcio pode ser fundamental em determinadas fases do ciclo de vida de algumas espécies, destacando-se *Cyathus stercoreus*, a qual forma micélio em meio sem cálcio, mas necessita dele para formar o corpo de frutificação (PUTZKE e PUTZKE, 2002). Chen *et al.* (2008), avaliaram a influência de diversos minerais ( $MgSO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4$  e  $CaCl_2 + MgSO_4$ ) sobre a produção de biomassa e EPS por *Fomes fomentarius*. A mistura  $CaCl_2 + MgSO_4$  proporcionou as maiores concentrações de biomassa micelial ( $7,9 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $0,88 \text{ g L}^{-1}$ ). Hwang *et al.* (2003), dentre os minerais avaliados ( $CaCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$  e  $MnSO_4$ ), obtiveram maior concentração de biomassa ( $3,33 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $2,03 \text{ g L}^{-1}$ ) por *Phellinus linteus* com a adição de  $CaCl_2$  ao meio de cultivo. Xiao *et al.* (2004) e Kim *et al.* (2005b) também obtiveram aumento da concentração de biomassa e EPS por *Cordyceps jiangxiensis* e *Cordyceps militaris* quando adicionaram  $CaCl_2$  ao meio de cultivo. Kim *et al.* (2005a), obtiveram as maiores concentrações de biomassa e EPS por *Agrocybe cylindracea* quando no meio de cultivo encontravam-se os sais  $CaCl_2$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Segundo Papagianni (2004) e Chardonnet *et al.* (1999), íons  $Ca^{2+}$  têm importante função no crescimento fúngico, bem como na composição da parede celular destes fungos em termos de polissacarídeos. Normalmente, um gradiente eletroquímico permite a difusão passiva de íons  $Ca^{2+}$  para dentro da célula por meio dos canais de proteínas, porém a baixa concentração citoplasmática destes íons é mantida por meio da atividade de bombas  $Ca/ATPase$ . Esse movimento de íons  $Ca^{2+}$  através da membrana celular gera gradientes internos e externos que favorecem a atividade de algumas enzimas envolvidas na expansão da parede celular e inibem a atividade de enzimas envolvidas na síntese de biopolímeros da parede celular, estimulando a excreção dos polissacarídeos. Desta forma, obtêm-se aumento da produção de EPS e diminuição da produção de polissacarídeos intracelulares (IPS).

Estudos referentes à otimização do meio de cultivo, relacionados tanto ao tipo de fontes de carbono e nitrogênio quanto as suas concentrações e, composição mineral do meio de cultivo, são de grande

importância quando se objetiva aumentar a produção de EPS por fungos. Jiao *et al.* (2008) estudaram a composição de um meio de cultivo a fim de maximizar a concentração de EPS por *Armillaria lúteo-virens* Sacc, um cogumelo comestível e medicinal muito conhecido na China. Estes pesquisadores definiram glicose e extrato de levedura como os constituintes que mais influenciaram a produção de EPS. Através de programas estatísticos e gráficos de superfície de resposta definiu-se como meio de cultivo otimizado ( $\text{g L}^{-1}$ ): glicose 31,26, extrato de levedura 1,06,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,50 e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,45. Desta forma, obteve-se concentração de EPS de  $5,40 \text{ g L}^{-1}$ , após 5 dias de cultivo. Fan *et al.* (2007) obtiveram aumento de 78,62 % na concentração de EPS por *Agaricus brasiliensis* após otimização do meio de cultivo.

#### **2.4.2 Condições de cultivo: temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de ar**

Condições de cultivo como temperatura, pH, vazão de ar e velocidade de agitação têm grande influência sobre a formação de EPS por fungos (BARBOSA *et al.*, 2004). Diferentes autores estudaram a influência destas condições de cultivo sobre a produção de EPS por fungos do gênero *Ganoderma*. Yang e Liao (1998) obtiveram maior concentração de EPS por *Ganoderma lucidum* quando utilizaram temperatura entre 30 e 35 °C, pH entre 4 e 4,5 e velocidade de agitação de 150 rpm. Lee *et al.* (1999) conduziram o cultivo de *Ganoderma lucidum* sem controle de pH, ou seja, evolução espontânea (o pH inicial de 6 caiu para quase 2,6 após 3 dias de cultivo) e em pH controlado em 6 durante todo o cultivo. A Figura 6 mostra a influência do valor do pH sobre a morfologia do micélio. Observa-se formação de “pellets” menores no cultivo conduzido em pH controlado. Além disso, o cultivo conduzido em pH controlado propiciou aumento da concentração de EPS de  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  para  $20,1 \text{ g L}^{-1}$ , sem prejudicar o crescimento microbiano, bem como, devido à modificação na morfologia dos “pellets”, manteve baixa a viscosidade do meio de cultivo. Papinutti (2010) avaliou a produção de EPS por *Ganoderma lucidum* em diferentes valores de pH (3,5 a 7,5). Maiores concentrações de EPS ( $139,01 \text{ mg g}^{-1}$ ) foram obtidas com pH 3,5.



**Figura 6 - Influência do pH sobre a morfologia do micélio de *Ganoderma lucidum*; (A) cultivo sem controle do pH e (B) pH controlado em 6,0.**

Fonte: LEE *et al.* (1999).

Segundo Xiao *et al.* (2006) o estudo do pH do meio de cultivo é muito importante quando se pretende maximizar a produção de EPS por fungos filamentosos, pois o pH afeta a função da membrana fúngica, a morfologia e a estrutura da célula, e conseqüentemente a utilização dos nutrientes do meio pelo fungo e a produção de EPS. Assim sendo, afeta conseqüentemente a reologia do meio de cultivo. Estes pesquisadores avaliaram a influência do pH (3 a 10) sobre a produção de biomassa e EPS por *Cordyceps jiangxiensis*. O valor de pH 7 propiciou maior concentração de biomassa ( $10,56 \text{ g L}^{-1}$ ) enquanto o valor de pH 6 propiciou maior concentração de EPS ( $4,6 \text{ g L}^{-1}$ ). Dentre as temperaturas avaliadas (22 a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ), não houve diferença entre os resultados obtidos com as temperaturas de 26 a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , as quais proporcionaram concentrações de biomassa e EPS de  $10,56$  e  $3,56 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Lee (2004), Huang e Liu (2008) e Shih *et al.* (2008) estudaram a influência do valor do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de biomassa micelial e de EPS por fungos do gênero *Grifola*. O primeiro pesquisador obteve maior concentração de biomassa e EPS por *Grifola frondosa* com pH inicial de 5,5 e temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , em frascos agitados. Quando se avaliou a influência das condições de cultivo em biorreator, em processo descontínuo, dentre os valores de pH (3 – 6), vazão de ar (0 – 2,5 vvm) e velocidade de agitação (50 – 300 rpm)

testados, valores de pH e aeração mais altos (pH 5, 1,66 vvm) e agitação mais baixa (166 rpm) propiciaram maiores concentrações de biomassa micelial (16,8 g L<sup>-1</sup>) e EPS (5,26 g L<sup>-1</sup>). Huang e Liu (2008) obtiveram maior concentração de biomassa e EPS por *Grifola umbellata* utilizando valores de pH 5 e 6, respectivamente. Valores de pH 4 e 5 favoreceram maior concentração de biomassa (2,7 g L<sup>-1</sup>) e EPS (0,8 g L<sup>-1</sup>), respectivamente, por *Grifola frondosa* (SHIH *et al.*, 2008).

Apesar de diferentes condições de cultivo serem exigidas para a produção de biomassa micelial e EPS por diferentes gêneros e espécies de fungos, pode-se dizer que grande parte dos fungos apresenta pH ótimo ácido (4,0 a 6,0) de crescimento e produção de EPS.

Wisbeck (2003) e Borges (2009) estudaram a influência do pH sobre a produção de biomassa micelial e EPS por fungos do gênero *Pleurotus*, ambas obtiveram concentrações e produtividades maiores em cultivos conduzidos em valores de pH mais ácidos. Wisbeck (2005), utilizando a espécie *P. ostreatus*, obteve maiores concentrações de biomassa micelial e EPS (12,8 e 1,33 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) em cultivos conduzidos em pH 4,0 ao invés de 6,0. Borges (2009), utilizando a espécie *P. djamor*, obteve maiores concentrações de biomassa micelial e EPS (7,11 e 2,11 g L<sup>-1</sup>) em cultivos conduzidos em pH 3,0 ao invés de 4,0.

Hwang *et al.* (2003) avaliaram a influência de diferentes temperaturas de cultivo (20, 25, 28, 30 e 35 °C) e diferentes valores de pH (3 a 9, variando uma unidade de pH) sobre o cultivo de *Phellinus linteus*. A temperatura de 30 °C foi a que propiciou tanto a maior concentração de biomassa micelial quanto de EPS. O valor de pH 5 propiciou a maior concentração de biomassa micelial e o pH 4 a maior concentração de EPS. No cultivo em biorreator utilizando 30 °C, vazão de ar 2 vvm, velocidade de agitação 50 rpm e pH inicial igual a 4, após 15 dias de cultivo, os autores obtiveram concentração máxima de biomassa micelial de 11 g L<sup>-1</sup>. A concentração máxima de EPS ocorreu após 14 dias de cultivo (3,3 g L<sup>-1</sup>).

Kim *et al.* (2005a) obtiveram as maiores concentrações de biomassa e EPS por *Agrocybe cylindracea* quando utilizaram temperatura de 25 °C. Maior concentração de biomassa micelial foi obtida em pH 4 e maior concentração de EPS em pH 6. Wu *et al.* (2006) estudaram o efeito do pH durante o cultivo líquido, em processo descontínuo, de *Auricularia auricula* sobre a produção de biomassa micelial e EPS. As mais altas concentrações de biomassa micelial e de EPS (7,5 g L<sup>-1</sup>) foram obtidas em pH 5,5 e 5, respectivamente. Portanto, realizou-se um cultivo mantendo-se o pH em 5 durante as 48 primeiras

horas e depois o pH foi ajustado para 5,5. Obteve-se então concentração e produtividade em EPS de  $8,7 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,091 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Cho *et al.* (2006) avaliaram a influência da temperatura e do pH inicial sobre a produção de biomassa e EPS por *Tremella fuciformis*, em frascos agitados. Dentre as temperaturas testadas (25, 28, 31 e  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ ) os menores valores de concentração de biomassa foram obtidos com a maior temperatura. Dentre a faixa de pH testados, 5 – 9, contrariando o esperado, já que a maioria dos fungos apresenta pH ótimo ácido de crescimento e produção de EPS, os valores 8 e 9 propiciaram maior concentração de biomassa e EPS, respectivamente. Assim como, os resultados obtidos por Pokhrel e Ohga (2007), os quais avaliaram a influência do pH inicial (5 a 9) do meio de cultivo sobre a produção de biomassa e EPS por *Lyophyllum decastes*. O pH 8 propiciou maior acúmulo de biomassa micelial ( $7,10 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH 7 propiciou maior concentração de EPS ( $1,73 \text{ g L}^{-1}$ ).

Cho *et al.* (2006), em ensaios em biorreator avaliaram a influência da velocidade de agitação (50, 200 e 400 rpm) sobre as concentrações de biomassa e EPS por *Tremella fuciformis*. A concentração máxima de biomassa micelial ( $7,03 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $2,00 \text{ g L}^{-1}$ ) foi obtida com 200 rpm. A velocidade específica de crescimento foi de  $0,25 \text{ dia}^{-1}$  e fator de conversão de glicose em EPS foi de  $0,099 \text{ g g}^{-1}$ . Em relação a vazão de ar (0,5, 1 e 2 vvm), maior concentração de biomassa micelial ( $10,12 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $2,32 \text{ g L}^{-1}$ ) foi obtida com 2 vvm. A velocidade específica de crescimento foi de  $0,21 \text{ dia}^{-1}$  e o fator de conversão de glicose em EPS foi de  $0,09 \text{ g g}^{-1}$ .

Chen *et al.* (2008) estudaram a influencia da temperatura e da velocidade de agitação sobre a produção de biomassa micelial e de EPS pelo cogumelo medicinal *Fomes fomentarius*. A temperatura ótima para a produção de biomassa micelial ( $7,48 \text{ g L}^{-1}$ ) e de EPS ( $0,81 \text{ g L}^{-1}$ ) foi  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A velocidade de agitação pôde variar de 120 a 180 rpm, sem influenciar a produção de biomassa micelial e EPS.

Segundo Barbosa *et al.* (2004), a função da agitação no meio de cultivo é melhorar a eficiência de mistura dos componentes do meio de cultivo, bem como auxiliar na liberação dos EPS aderidos à biomassa micelial. Porém, velocidades muito altas produzem efeito negativo sobre a produção de biomassa micelial e formação de polissacarídeos.

### 2.4.3 Propriedades reológicas dos meios de cultivo

Dependendo do sistema microbiano, alguns EPS formam cápsulas ao redor da célula tornando-se parte da parede celular,

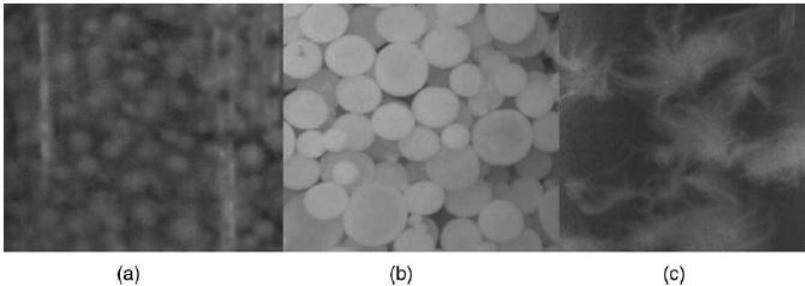
enquanto outros formam grumos fora da parede celular e têm habilidade para se difundirem para dentro da fase líquida durante o processo de cultivo. Como resultado da produção de EPS, as propriedades reológicas do cultivo podem produzir mudanças no meio, começando como um fluido newtoniano de baixa viscosidade e finalizando como um fluido não-newtoniano de elevada viscosidade. Os microrganismos que produzem grandes quantidades de grumos têm maior potencial para aplicação industrial, considerando ser um processo mais simples a recuperação/extração de EPS do meio de cultivo (SILVA *et al.*, 2006).

A natureza viscosa do caldo de cultivo de alguns fungos filamentosos pode ocasionar sérios problemas durante a fermentação. Quanto mais viscoso for o meio, maior a potência necessária para a agitação e mais difícil será a obtenção de uma mistura homogênea principalmente em larga escala. Assim, menos eficiente será a transferência de massa do sistema agitado e, conseqüentemente menor a solubilização de O<sub>2</sub> no meio de cultivo dos processos aeróbios. A transferência de oxigênio em sistemas agitados e aerados é função de uma série de variáveis dentre as quais encontra-se a viscosidade (BORZANI *et al.*, 2001b).

O meio de cultivo tende a se tornar bastante viscoso em cultivos submersos de fungos devido à biomassa filamentosa dos microrganismos e aos EPS dissolvidos no meio de cultivo (CUI & CHISTI, 2003). Segundo Cho *et al.* (2006) a reologia do meio, nestes cultivos, está frequentemente relacionada com a morfologia da célula e com a concentração de biomassa micelial e de EPS. Muitos pesquisadores demonstraram que a reologia do meio durante o cultivo de fungos, em média após 5 dias de cultivo, tem comportamento pseudoplástico ao invés de newtoniano, o que influencia negativamente a produção do produto de interesse. A reologia do meio de cultivo para *Aureobasidium pullulans*, um fungo dimórfico como *Tremella fuciformis*, é newtoniano no início do cultivo, porém com o aumento da concentração do produto torna-se pseudoplástico (LEDUY *et al.*, 1974 citado por CHO *et al.*, 2006). Analisando a influência da velocidade de agitação (200 rpm) e da vazão de ar (2 vvm) sobre a viscosidade do meio de cultivo para produção de biomassa e de EPS por *Tremella fuciformis* em biorreator, observou-se características de cultivo newtoniano e viscosidade máxima de 35 cP, em condições de alta vazão de ar (2 vvm). A velocidade de agitação não apresentou efeito significativo sobre a viscosidade do meio (CHO *et al.*, 2006).

Lee *et al.* (2004) estudaram a morfologia do fungo *Grifola frondosa*, em função do pH do meio de cultivo, da vazão de ar e da

velocidade de agitação, em processo descontínuo. Utilizando as condições definidas como ótimas para obtenção de biomassa micelial e EPS, ou seja, 1,66 vvm, pH 5 e 166 rpm, os autores não observaram a formação de “pellets”, e sim de micélio solto no meio de cultivo (Figura 7) mantendo baixa a viscosidade do meio de cultivo.



**Figura 7 - Mudanças na morfologia do micélio em função das seguintes condições de cultivo (a) pH 6,0, vazão de ar 0,5 vvm, velocidade de agitação 100 rpm; (b) pH 4,0, vazão de ar 0,5 vvm, velocidade de agitação 250 rpm; (c) pH 5,0, vazão de ar 1,16 vvm, velocidade de agitação 166 rpm (condição otimizada).**

Fonte: LEE *et al.*, 2004.

#### 2.4.4 Processos de cultivo

Segundo Cui e Chisti (2003), a produção de EPS por fungos de uso medicinal se dá preferencialmente por meio de cultivo submerso ao invés de cultivo sólido. O cultivo submerso apresenta algumas vantagens sobre o cultivo sólido como: maior controle das condições de cultivo, menor esforço e espaço para o cultivo, bem como menor risco de contaminação. Entretanto, o sucesso de um cultivo submerso depende muito de uma correta definição dos seguintes itens: microrganismo, meio de cultivo, etapas de recuperação do produto e forma de condução do processo de cultivo.

Quanto a sua forma de condução, o cultivo pode ser classificado em descontínuo simples, descontínuo alimentado, semi-contínuo e contínuo. Um processo muito utilizado é o descontínuo, devido aos menores riscos de contaminação e grande flexibilidade de operação. Este processo pode ser assim descrito: no instante inicial a solução nutriente esterilizada no biorreator é inoculada com microrganismos e incubada, de modo a permitir que o cultivo ocorra sob condições ótimas.

No decorrer do cultivo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbios (na forma de ar), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. Terminado o cultivo, descarrega-se a dorna, e o caldo fermentado segue para os tratamentos finais. Então, deve-se lavar a dorna, esterilizá-la e recarregá-la com o meio de cultivo e inóculo. Conclui-se que, se não houver adição de soluções para controle do processo, nem perda de líquido por evaporação, o volume no decorrer do cultivo permanece constante (BORZANI *et al.*, 2001a).

O processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em que um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final do cultivo. Em alguns casos todos os nutrientes são gradualmente alimentados à dorna. Adicionalmente, este conceito pode ser estendido para o acréscimo de aditivos, tais como precursores de produtos. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de caldo de cultivo pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (BORZANI *et al.*, 2001a; ACEVEDO & GENTINA, 2002).

O processo semi-contínuo é assim chamado porque tanto o fluxo de entrada do meio de cultivo no biorreator quanto o de saída de caldo fermentado são intermitentes. O processo inicia como descontínuo simples, porém dado o tempo de processo, retira-se parte do meio fermentado, mantém-se no biorreator o restante do caldo fermentado e adiciona-se ao biorreator o mesmo volume de meio de cultivo. Como vantagem, apesar das poucas publicações utilizando este tipo de processo, pode-se citar a possibilidade de operar o biorreator por longos períodos de tempo sem a necessidade de se preparar novo inóculo, bem como aumento da produtividade do processo apenas modificando o cronograma de trabalho.

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultivo a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado. A manutenção do volume constante no biorreator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto)

permanecem constantes ao longo do cultivo. Como vantagens deste processo pode-se citar o aumento da produtividade, em virtude da redução dos tempos mortos ou não produtivos, a obtenção de caldo fermentado uniforme, facilitando as etapas posteriores de recuperação do produto de interesse, manutenção das células em um mesmo estado fisiológico e menor necessidade de mão-de-obra. Como desvantagens, pode-se citar maior investimento inicial na planta, maior possibilidade de ocorrência de contaminações, por se tratar de um sistema essencialmente aberto, dificuldade de manutenção de homogeneidade no biorreator, quando se trabalha com baixas vazões e, em algumas situações, dificuldade de operação em estado estacionário (BORZANI *et al.*, 2001a; ACEVEDO & GENTINA, 2002).

Tang e Zhong (2002) estudaram o cultivo de *Ganoderma lucidium* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de lactose. Quando a concentração de lactose no meio de cultivo baixou para  $10 \text{ g L}^{-1}$ , adicionou-se uma solução concentrada de lactose a fim de se elevar a concentração para  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Após 20 dias de cultivo obteve-se  $0,87 \text{ g L}^{-1}$  de concentração máxima de EPS, aproximadamente 43 % maior que a obtida em processo descontínuo simples. A produtividade máxima em EPS foi de  $1,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Zou (2006) estudou o cultivo de *Agaricus brasilienses* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de glicose. A adição de uma solução concentrada de glicose foi realizada a cada 24 h, durante o período de 72 a 120 horas, a fim de aumentar a concentração de glicose para  $15 \text{ g L}^{-1}$ , pois em cultivo realizado em processo descontínuo simples, após 72 horas se atinge a metade da fase de máxima velocidade de formação de biomassa micelial e produtos, sendo a concentração residual de glicose neste instante aproximadamente  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Por meio do processo descontínuo com pulsos de glicose o autor conseguiu aumentar a concentração de EPS em 26,9 % (aproximadamente  $1,67 \text{ g L}^{-1}$ ) em comparação com o processo descontínuo simples.

Shih *et al.* (2008) estudaram o cultivo de *Grifola frondosa* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de glicose, pois de acordo com experimentos realizados anteriormente por estes pesquisadores, em processo descontínuo simples, verificou-se que a fonte de carbono esgotava-se antes que biomassa micelial e produto atingissem suas concentrações máximas. Os autores justificaram este fato devido à concentração insuficiente da fonte de carbono no meio de cultivo. Contudo, como é sabido que muitas vezes concentrações elevadas de nutrientes adicionadas no início do cultivo levam a inibição do crescimento celular e formação de produto, os autores optaram por

estudar o processo descontínuo com pulsos de glicose. Quando a concentração de glicose atingiu a concentração de 0,5 % ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), após aproximadamente 6 dias de cultivo, adicionou-se no meio de cultivo uma solução concentrada de glicose a fim de se elevar a concentração para 1,5 % ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ). A adição de solução de glicose foi realizada por seis vezes (após 6, 7, 9, 9,5, 11 e 12 dias de cultivo). Após 13 dias de cultivo as concentrações de biomassa micelial e EPS foram  $8,23 \text{ g L}^{-1}$  e  $3,88 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações de biomassa micelial e EPS obtidas com o processo descontínuo com pulsos de glicose foram 22,8 % e 17,6 %, respectivamente, superiores às obtidas com o processo descontínuo simples.



### 3. JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRATÉGIA

Conforme visto no capítulo anterior, diversos estudos têm buscado aumentar, por meio da modificação do meio e das condições de cultivo, a produção de EPS por diferentes basidiomicetos. Contudo, estudos sobre a produção de EPS por fungos do gênero *Pleurotus* são ainda escassos na literatura, podendo-se citar poucos autores como: Burns *et al.* (1994), Maziero *et al.* (1999), Rosado *et al.* (2003), Wisbeck (2005), Libardi-Jr *et al.* (2007), Confortin *et al.* (2008), Gern *et al.* (2008) e Borges (2009). Estudos sobre a ação medicinal de EPS produzidos por este gênero, entretanto, são fartos na literatura, comprovando sua importância medicinal.

Em função disso, buscou-se estudar o desempenho de duas espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus* e *P. sajor-caju*) na produção de EPS frente a diferentes composições de meio, condições de cultivo e formas de condução do processo de produção, conforme descrito a seguir.

#### 3.1 3.1. PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR *Pleurotus ostreatus*

O cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* em processo descontínuo simples foi estudado pelo grupo de pesquisa em “Processos Biotecnológicos” da UNIVILLE (WISBECK *et al.*, 2005; GERN *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2008). Nesses trabalhos, foram estudados, principalmente, o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio constituintes do meio de cultivo, diferentes valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ), de pH, dentre outros, sobre a produção de biomassa micelial e EPS. Contudo, não se encontrou em literatura estudos sobre a influência do tipo de processo de cultivo sobre a produção de EPS por fungos do gênero *Pleurotus*.

Portanto, o primeiro e o segundo objetivos específicos deste trabalho foram avaliar a produção de EPS por *Pleurotus ostreatus* utilizando os processos descontínuo com pulsos de glicose e semi-contínuo com cortes de 50 e 75% do volume de meio de cultivo.

### **3.1.1 Cultivo de *Pleurotus ostreatus* em processo descontínuo com pulsos de glicose**

A estratégia de cultivo de *Pleurotus ostreatus* em processo descontínuo com pulsos de glicose foi definida com base no cultivo prévio de *Pleurotus ostreatus* em processo descontínuo simples realizado por Wisbeck *et al.* (2005), utilizando o mesmo meio e condições de cultivo desse trabalho. Sendo assim, os cultivos conduzidos em processo descontínuo com pulsos de glicose foram alimentados com solução concentrada de glicose sempre que a concentração de glicose no meio de cultivo atingia valor entre 20 – 25 g L<sup>-1</sup>, a fim de elevar este valor para 30 g L<sup>-1</sup>, pois Wisbeck *et al.* (2005) observaram aumento da concentração de EPS até aproximadamente 200 horas de cultivo, sendo a concentração de glicose neste instante aproximadamente 20 g L<sup>-1</sup>. Além disso, os autores observaram que o tempo correspondente à metade da fase de máxima velocidade de formação de EPS (150 horas) a concentração de glicose era de 30 g L<sup>-1</sup>.

### **3.1.2 Cultivo de *Pleurotus ostreatus* em processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo**

A estratégia de cultivo de *Pleurotus ostreatus* em processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo também teve como base os resultados obtidos previamente por Wisbeck *et al.* (2005) pelos motivos descritos em 3.1.1. Os cultivos tiveram 50 e 75 % do volume de trabalho retirado do biorreator sempre que a concentração de glicose no meio de cultivo atingiu valor entre 20 - 25 g L<sup>-1</sup>. Em seguida, o mesmo volume de meio de cultivo POL, contendo glicose em concentração suficiente para que esta retornasse a 40 g L<sup>-1</sup>, foi adicionado ao biorreator.

## **3.2 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR *Pleurotus sajor-caju***

Sabe-se de resultados obtidos pelo grupo de pesquisa em processos biotecnológicos da UNIVILLE que, em experimentos realizados em frascos agitados, *Pleurotus sajor-caju* produziu menor concentração de EPS que *Pleurotus ostreatus*. Porém, é fato também que a ação antitumoral *in vivo* desta espécie foi superior a de *Pleurotus*

*ostreatus* (MIZUNO, 1999; DALONSO *et al.*, 2009), o que justifica o interesse em maximizar sua produção.

### **3.2.1 Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em processo descontínuo simples**

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho, utilizando a espécie *Pleurotus ostreatus*, com aqueles obtidos por Wisbeck *et al.* (2005), utilizando a mesma espécie fúngica, decidiu-se realizar o cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em processo descontínuo simples. Contudo, a formação de aglomerados (“pellets”) muito grandes de micélio no caldo de cultivo, provavelmente devido a não excreção dos polissacarídeos para o meio e a aderência destes à biomassa micelial, impossibilitou a homogeneização do meio de cultivo e, conseqüentemente, a continuidade do experimento.

### **3.2.2 Determinação das concentrações iniciais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja sobre a produção de biomassa micelial e EPS**

Considerando as dificuldades em conduzir o processo devido a alteração da reologia do meio (item 3.2.1.), decidiu-se alterar o meio de cultivo a fim de reduzir a formação de “pellets”. Investigou-se, portanto, a influência de menores concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja, constituintes do meio de cultivo POL, sugerido por Cavazzoni e Adami (1992) para a produção de EPS por basidiomicetos e ascomicetos, sobre a produção de biomassa e EPS por *Pleurotus sajor-caju*. Sendo este o terceiro objetivo específico deste trabalho.

Para tanto, realizou-se o cultivo de *Pleurotus sajor-caju*, em frascos agitados, em 8 diferentes meios de cultivo, cuja formulação foi obtida por meio de um planejamento fatorial  $2^3$ , variando-se as concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja. A composição restante do meio de cultivo POL não foi modificada e a concentração inicial de glicose utilizada foi de  $20 \text{ g L}^{-1}$ . O meio de cultivo POL proposto por Cavazzoni e Adami (1992) utiliza em sua formulação  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Contudo, para os experimentos realizados em frascos agitados este composto não foi utilizado, pois o cultivo ocorre em pH livre, sendo o pH inicial próximo da neutralidade, o que impossibilita a solubilização deste composto, tornando o meio de cultivo turvo e impedindo a visualização de contaminações.

### 3.2.3 Estudo da influência do pH, da adição de $\text{CaCO}_3$ e da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju*

De acordo com experimentos realizados por Wisbeck (2003), *Pleurotus ostreatus* apresentou maior produção de EPS em pH 4,0 que em pH 5,0. E, de acordo com a análise de seus dados (gráficos de superfície de resposta), a tendência seria obter-se maior concentração de EPS em valores de pH menores ainda. Além disso, de acordo com Borges (2009), maiores concentrações de EPS foram obtidas por *P. djamor* quando utilizou-se pH de cultivo igual a 3,0 ao invés de 4,0. Portanto, o quarto objetivo específico deste trabalho foi estudar o cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em processo descontínuo, utilizando-se o meio de cultivo POL modificado (item 3.2.2.), em pH 3,0, pH 4,0 e pH livre.

Sabe-se de literatura (HWANG *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005a; KIM *et al.*, 2005b) que a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de cultivo proporciona aumento da excreção de polissacarídeos para o meio de cultivo e, conseqüentemente, aumento da produção de EPS por diversos basidiomicetos. Portanto, a fim de aumentar a excreção de polissacarídeos, diminuindo a presença de polissacarídeos aderidos a biomassa micelial e, com isso, minimizar a formação de “pellets” grandes que inviabilizem a condução dos experimentos, o quinto objetivo específico foi avaliar a influência da adição de  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) ao meio de cultivo sobre a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju*.

Sabe-se, ainda, de literatura que geralmente maiores concentrações iniciais de glicose levam a maiores concentrações de EPS fúngicos (BURNS *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 2004; ZOU, 2006; CHEN, 2007; GERN *et al.*, 2008; JIAO *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2009). De acordo com Libardi-Jr *et al.* (2007), em experimentos realizados com *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados, maior concentração de EPS foi obtida quando utilizou-se concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de 20, 40 ou  $80 \text{ g L}^{-1}$ . Portanto, o sexto e último objetivo específico foi avaliar o cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em processo descontínuo simples utilizando concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

A linhagem de *Pleurotus ostreatus* foi obtida da “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb” sob o código DSM 1833 e a linhagem de *Pleurotus sajor-caju* foi obtida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos da Universidade de São Paulo sob o código de CCB 019.

### 4.2 MEIOS DE CULTIVO

#### 4.2.1 Meio de manutenção

Ambas as espécies foram mantidas em meio sólido TDA, composto por 1,0 L de extrato de trigo, 20 g de dextrose e 15 g de ágar, conforme proposto por Furlan *et al.* (1997), sob refrigeração (4 °C) e os repiques feitos a cada três meses.

O extrato de trigo foi obtido mediante a infusão de 500 g de trigo, previamente lavados, em 1,0 L de água deionizada. Após 10 minutos de fervura, a mistura foi filtrada e o extrato usado para preparar o meio TDA, o qual foi esterilizado em autoclave por uma hora.

#### 4.2.2 Meio de cultivo POL

O meio de cultivo POL foi composto por 5,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1,0 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, conforme proposto por Cavazzoni e Adami (1992) para produção de EPS por basidiomicetos e ascomicetos. A concentração inicial de glicose foi de 20 g L<sup>-1</sup>.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo para os cultivos em frascos agitados consistiu de dois discos de ágar de 15,0 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico de colônias contidas na região periférica de uma placa de Petri, para cada 100 mL de meio de cultivo.

Para os cultivos em biorreator utilizou-se 400 mL (ou seja, 10 % do volume útil do biorreator) de meio de cultivo POL sem  $\text{CaCO}_3$  e com adição de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Optou-se por não utilizar  $\text{CaCO}_3$ , pois como não é possível controlar o valor do pH do meio de cultivo nesta etapa do processo, realizada em frascos da marca Duran (2,0 L), o  $\text{CaCO}_3$  não se dissocia, gerando um meio de cultivo turvo que dificulta a detecção de contaminantes. Os frascos foram inoculados com micélio de 7 dias, contido em uma placa de Petri. Em seguida, foram incubados a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  em agitador B.BRAUN, modelo CERTOMAT U, com agitação recíproca de  $120 \text{ min}^{-1}$ , por seis dias (FURLAN *et al.*, 2008).

#### 4.4 CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

##### **4.4.1 Cultivo de *P. ostreatus* em processos descontínuo com pulsos de glicose e semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo**

Os ensaios foram conduzidos em biorreator de mistura completa, modelo MD B. BRAUN, com dorna de capacidade de 5 L e volume de trabalho de 4 L. Utilizou-se meio de cultivo POL, com concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g L}^{-1}$ . O pH foi controlado em 4, por meio da adição automática de soluções de NaOH 6 N e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  12 N, tendo acoplado ao biorreator um sensor de pH. A temperatura foi mantida em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  através de circulação de água na camisa do biorreator e monitorada por um sensor de temperatura. A vazão de ar foi mantida em  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  e a velocidade de agitação em 300 rpm, resultando em valor de  $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$  (FURLAN *et al.*, 2008). O sistema possuía três turbinas, com seis pás planas, estando a primeira turbina situada imediatamente acima do anel dispersor de ar. O diâmetro das turbinas é de 63 mm e a distância entre elas de 75 mm.

As estratégias de condução dos experimentos em processo descontínuo com pulsos de glicose e semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo foram definidas com base no cultivo prévio de *P. ostreatus* em processo descontínuo simples realizado por Wisbeck *et al.* (2005), utilizando o mesmo meio e condições de cultivo deste trabalho. Sendo assim, os cultivos conduzidos em processo descontínuo com pulsos de glicose foram alimentados com solução concentrada de glicose sempre que a concentração de glicose no meio de cultivo atingiu valor entre  $20 - 25 \text{ g L}^{-1}$ , a fim de elevar este valor para  $30 \text{ g L}^{-1}$ . As concentrações das soluções de glicose, adicionadas a cada pulso, foram calculadas de acordo com a concentração de glicose obtida

no último ponto de amostragem, normalmente em torno de 20 – 25 g L<sup>-1</sup>, e com o volume disponível no biorreator devido à retirada de amostras. Deste modo, tanto o volume quanto a concentração da solução de glicose foram variáveis ao longo do cultivo. O cultivo foi conduzido por 14 dias, período no qual realizou-se a alimentação do biorreator com solução concentrada de glicose por 4 vezes.

Os cultivos conduzidos em processo semi-contínuo, com cortes de 50 e 75% do volume de meio de cultivo, tiveram 50 e 75 % do volume de trabalho, ou seja, 2 e 3 L de caldo de cultivo, respectivamente, retirados do biorreator sempre que a concentração de glicose no meio de cultivo atingiu valor entre 20 - 25 g L<sup>-1</sup> (concentração de substrato de corte). Em seguida, o mesmo volume de meio de cultivo POL, contendo glicose em concentração suficiente para que esta retornasse a 40 g L<sup>-1</sup>, foi adicionado ao biorreator. As concentrações de glicose, adicionadas ao meio de cultivo POL após cada corte, foram calculadas de acordo com a concentração de glicose obtida no último ponto de amostragem do ciclo ou tempo de residência, normalmente em torno de 20 – 25 g L<sup>-1</sup>, e com o volume disponível no biorreator devido à retirada de caldo (50 e 75 % do volume). Os cultivos com corte de 50 % foram conduzidos por 26 dias. Os cultivos com corte de 75 % foram conduzidos por 21 dias. Em ambos os cultivos realizou-se 3 cortes, totalizando 4 ciclos ou tempos de residência.

#### **4.4.2 Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em processo descontínuo simples**

O ensaio foi conduzido conforme metodologia descrita no primeiro parágrafo do item 4.4.1. (FURLAN, *et al.*, 2008).

##### **4.4.2.1 Determinação das concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja no meio de cultivo POL**

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, sendo os meios de cultivo formulados de acordo com planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, variando-se as concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja do meio de cultivo POL, proposto por Cavazzoni e Adami (1992) (Tabelas 1 e 2). O experimento 1 da Tabela 2, utiliza as concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja originais do meio de cultivo POL. A composição restante do meio de cultivo POL

não foi modificada e a concentração inicial de glicose utilizada foi de 20 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1 - Planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada fator como inferior e superior, respectivamente.**

Variáveis	Nível	
	+	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (g L <sup>-1</sup> )	5	2,5
Extrato de levedura, (g L <sup>-1</sup> )	2	1
Peptona de soja, (g L <sup>-1</sup> )	1	0,5

**Tabela 2 - Concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja de cada ensaio, definido através do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1).**

Ensaio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	Peptona de soja (g L <sup>-1</sup> )
1	5	2	1
2	5	2	0,5
3	5	1	1
4	5	1	0,5
5	2,5	2	1
6	2,5	2	0,5
7	2,5	1	1
8	2,5	1	0,5

Cada frasco foi inoculado conforme descrito no primeiro parágrafo do item 4.3, incubado a 30 °C, em agitação recíproca de 120 min<sup>-1</sup>, durante 7 dias. O tempo de cultivo foi definido com base no cultivo prévio de *P. sajor-caju*, em frascos agitados, realizado por Monteiro *et al.* (2006). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.2.2 Determinação do pH de cultivo, da adição de CaCO<sub>3</sub> e da concentração inicial de glicose no meio de cultivo

Os ensaios foram conduzidos conforme metodologia descrita no primeiro parágrafo do item 4.4.1. (FURLAN, *et al.*, 2008), sendo a concentração inicial de glicose utilizada nos ensaios para determinação

do pH e da adição de  $\text{CaCO}_3$  ao meio de cultivo igual a  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Nos ensaios para determinação da concentração inicial de glicose testou-se, além de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , a concentração de  $60 \text{ g L}^{-1}$ . O meio de cultivo utilizado em todos os ensaios foi o POL modificado ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura;  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja), conforme definido no item 4.4.2.1. Os ensaios foram conduzidos em processo descontínuo simples.

A escolha dos valores de pH a serem avaliados deu-se com base em estudos prévios realizados por Wisbeck *et al.* (2005) e Borges (2009). Assim como, a escolha por se avaliar a influência da presença de íons cálcio no meio cultivo sobre a produção de EPS, teve como base estudos realizados por Chardonnet *et al.*, 1999, Hwang *et al.*, 2003, Papagianni, 2004, Xiao *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005a, Kim *et al.*, 2005b e Chen *et al.* (2008). Com base em estudos prévios realizados por Libardi Jr *et al.* (2007), definiu-se avaliar, em ensaios em biorreator, concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

Inicialmente conduziu-se os ensaios em pH 3,0, em seguida em pH 4,0 e em pH livre (evolução espontânea). Após a determinação do pH, os ensaios foram conduzidos com adição de  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) ao meio de cultivo, sendo o pH, deste ensaio em diante, controlado no valor definido no experimento anterior. Em seguida, os ensaios foram conduzidos utilizando-se concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ , com adição de  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 Concentração de biomassa micelial

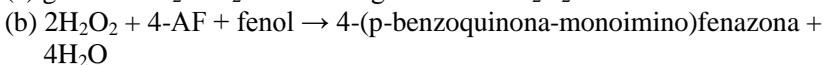
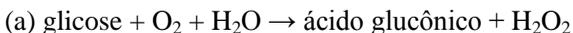
A concentração celular foi determinada pelo método gravimétrico.

Nos ensaios conduzidos em frascos agitados, ao final do cultivo, toda a biomassa micelial foi filtrada em papel Whatman n<sup>o</sup> 1, previamente seco por 24 h a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . A massa obtida após secagem por 72 h a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  foi dividida pelo volume do conteúdo contido no frasco Erlenmeyer no final do cultivo. O resultado foi expresso em  $\text{g L}^{-1}$ .

Nos ensaios conduzidos em biorreator, amostras de aproximadamente 20 mL, retiradas periodicamente do biorreator, foram filtradas em papel Whatman n<sup>o</sup> 1, lavadas com água destilada, transferidas para um cadinho pré-pesado e secas por 72 h a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . A massa obtida foi dividida pelo volume de amostra.

### 4.5.2 Concentração de glicose

A concentração de glicose foi medida pelo método Glicose-E (CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos). Neste método, a glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada (a). Em presença de peroxidase (POD),  $\text{H}_2\text{O}_2$  produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF), dando lugar à formação de um cromógeno vermelho cereja (b), cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução em análise (TRINDER, 1969). A seqüência reacional é apresentada a seguir:



O procedimento completo é descrito a seguir:

- As amostras foram diluídas em água deionizada de modo a se obter soluções de glicose com concentração entre  $0,1$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$ ;
- A  $20\mu\text{L}$  de cada solução diluída foi adicionado  $1,0 \text{ mL}$  de reativo GOD-POD;
- A mistura foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos;
- As medições de absorvância foram realizadas a  $505 \text{ nm}$  em espectrofotômetro (modelo UV-160A, SHIMADZU), tendo como branco uma preparação idêntica, na qual a amostra foi substituída por água;
- Em paralelo às amostras analisadas, quatro soluções padrões contendo  $0,1$ ,  $0,5$ ,  $0,8$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, sofreram o mesmo tratamento.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, foi definida uma equação, por regressão linear, através da qual foram calculadas as concentrações de glicose nas amostras.

### 4.5.3 Extração e determinação da concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS)

Após a separação da biomassa micelial, as amostras de  $10 \text{ mL}$  foram tratadas com acetona resfriada a  $4^\circ\text{C}$ , na proporção

acetona:amostra 3:1 (V/V) (MAZIERO, 1996). Após 24 h sob refrigeração (4 °C), para precipitação dos EPS, as amostras foram centrifugadas a 4500 g por 5 minutos, lavadas duas vezes com 20 mL da solução acetona:etanol:água destilada, na proporção 3:1:1 (V/V/V) (CAVAZZONI & ADAMI, 1992). Por último as amostras de EPS foram ressuspensas em volume total de 10 mL utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%.

A concentração de EPS foi estimada indiretamente através da determinação de açúcares totais pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Este método baseia-se no fato de que os ácidos fortes (ácido sulfúrico) desidratam os glicídios, dando origem a aldeídos cíclicos (furfural ou derivados), que podem combinar-se com diversos fenóis formando compostos corados, cuja coloração é diretamente proporcional à concentração de açúcares solúveis no meio reativo (REMIÃO *et al.*, 2003).

O procedimento completo é descrito a seguir: em um tubo de ensaio adiciona-se 0,5 mL da amostra a ser analisada devidamente diluída, 0,5 mL de uma solução de fenol a 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixou-se reagir por 20 min em temperatura entre 25 e 30 °C e mede-se a absorbância em espectrofotômetro, a 490 nm.

Para o preparo da curva padrão, substitui-se a amostra por 0,5 mL de soluções padrão de glicose com concentrações variando de 0,01 a 0,1 g L<sup>-1</sup>. O equipamento foi calibrado com uma solução na qual a amostra foi substituída por água. Com base nas leituras obtidas com os padrões, foi construída uma curva de correlação entre absorbância e concentração (g L<sup>-1</sup>) cuja equação da regressão linear permitiu calcular a concentração de açúcares solúveis totais nas amostras.

## 4.6 METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS

### 4.6.1 Concentrações

#### 4.6.1.1 Variação da concentração de EPS

$$\Delta P_{m\acute{a}x} = P_{m\acute{a}x} - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad (4.1)$$

em que P<sub>máx</sub> refere-se à concentração máxima de EPS obtida no cultivo e P<sub>0</sub> a concentração de EPS no início do cultivo.

#### 4.6.1.2 Variação da concentração de biomassa micelial

$$\Delta X = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad (4.2)$$

em que X refere-se a concentração de biomassa micelial correspondente a  $P_{\text{máx}}$  e  $X_0$  a concentração de biomassa micelial no início do cultivo.

### 4.6.2 Fatores de conversão

#### 4.6.2.1 Fator de conversão de glicose em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ )

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (4.3)$$

em que S e  $S_0$  referem-se as concentrações de glicose no tempo correspondente à  $P_{\text{máx}}$  e no início do cultivo, respectivamente.

#### 4.6.2.2 Fator de conversão de glicose em EPS ( $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\text{máx}} - P_0}{S_0 - S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (4.4)$$

### 4.6.3 Produtividades

#### 4.6.3.1 Produtividades globais em biomassa micelial (QX) e EPS (QP)

$$QX = \frac{X - X_0}{t_P} \quad [\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4.5)$$

$$QP = \frac{P_{\text{máx}} - P_0}{t_P} \quad [\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4.6)$$

em que  $t_P$  é o tempo de cultivo correspondente à  $P_{\text{máx}}$  (h).

#### 4.6.3.2 Produtividades máximas em biomassa micelial (QX<sub>máx</sub>) e EPS (QP<sub>máx</sub>)

$$QX_{máx} = \frac{X_m - X_0}{t_X} \quad [\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4.7)$$

$$QP_{máx} = \frac{P_m - P_0}{t_E} \quad [\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4.8)$$

em que  $X_m$  refere-se a concentração de biomassa micelial correspondente à QX<sub>Max</sub>, ou seja, no tempo em que a produtividade em células foi máxima ( $t_X$ ). E  $P_m$  refere-se a concentração de EPS correspondente à QP<sub>Max</sub>, ou seja, no tempo em que a produtividade em EPS é máxima ( $t_E$ ).

Para os ensaios descritos no item 4.4.2.2. as curvas cinéticas foram traçadas utilizando-se os pontos de ambas as repetições (duplicatas) e os valores utilizados para cálculo dos parâmetros de processo foram retirados diretamente destas curvas.

#### 4.6.4 Velocidades de consumo de glicose e velocidades específicas máximas de crescimento

As velocidades de consumo de glicose ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram determinadas através do cálculo das médias das velocidades instantâneas, obtidas por meio do método de LEDUY & ZAJIC (1973), ou seja, pelo cálculo das derivadas a partir dos pontos experimentais de concentração de substrato em função do tempo.

As velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{máx}, \text{h}^{-1}$ ) foram determinadas através dos coeficientes angulares das tangentes às curvas obtidas com os valores dos logaritmos neperianos das concentrações celulares com os seus respectivos tempos de cultivo.

#### 4.7 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS CINÉTICAS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos com os ensaios descritos no item 4.4.2.1., conduzidos em frascos agitados, foram avaliados através do Teste Q de Dixon, com nível de confiança de 95%, a fim de avaliar a rejeição de valores desviantes (RORABACHER, 1991). O software Statistica® 7.0

foi utilizado para avaliação das médias dos ensaios por meio do Teste de Pareto (BARROS NETO *et al.*, 1996) que permite identificar e quantificar o efeito de cada variável, e de suas interações, sobre os resultados obtidos. No caso desse estudo, sobre as concentrações de biomassa micelial e EPS produzidos por *P. sajor-caju*.

As curvas cinéticas obtidas com os ensaios descritos no item 4.4.2.2., conduzidos em biorreator, foram traçadas utilizando-se os pontos de ambas as repetições (duplicatas). Estas curvas, bem como as obtidas com os demais ensaios (itens 4.4.1. e 4.4.2.) foram confeccionadas utilizando-se dois programas concomitantemente (a) o software para tratamento de dados experimentais de cultivos microbianos (EMERSON) desenvolvido no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT) por Wagner Bruna e Manuel F. Barral e (b) o programa Origin 8.0 PRO®. O software Origin 8.0 PRO® foi também utilizado para verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros de processo das repetições, por meio do Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR *Pleurotus ostreatus*

#### 5.1.1 Cultivo em processo descontínuo com pulsos de glicose

A Figura 8 apresenta as curvas cinéticas referentes ao cultivo de *P. ostreatus* conduzido em biorreator de bancada, em processo descontínuo com pulsos de glicose, utilizando meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4,0, temperatura  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).

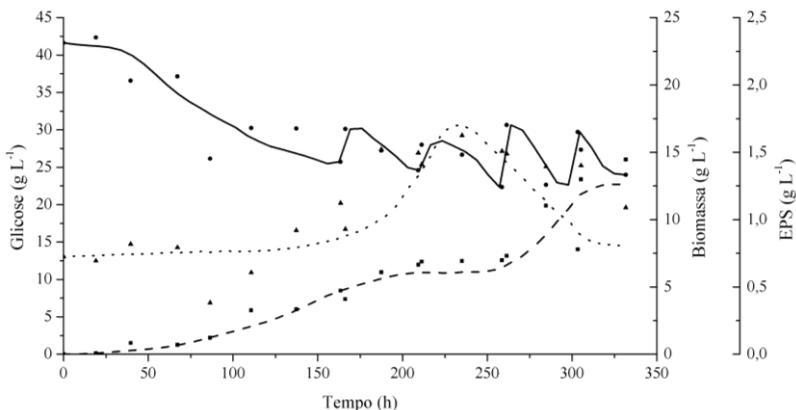


Figura 8 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada, -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (horas) durante o cultivo de *P. ostreatus* em processo descontínuo com pulsos de glicose, em meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4,0, temperatura  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).

De acordo com a Figura 8, observa-se a alimentação do biorreator com pulsos intermitentes de solução concentrada de glicose em 169, 217, 264 e 304 horas de cultivo. Os pulsos de glicose foram realizados sempre que a concentração de glicose no meio de cultivo diminuiu para 20 - 25 g L<sup>-1</sup>, a fim de elevar a concentração para 30 g L<sup>-1</sup>. Esta estratégia de cultivo foi adotada com base no cultivo prévio de *P. ostreatus* em processo descontínuo simples realizado por Wisbeck *et al.* (2005), utilizando o mesmo meio e condições de cultivo deste trabalho. Wisbeck *et al.* (2005) observaram aumento da concentração de EPS até aproximadamente 200 horas de cultivo, sendo em seguida o EPS degradado. Em 200 horas a concentração de glicose era de aproximadamente 20 g L<sup>-1</sup>. No tempo correspondente à metade da fase de máxima velocidade de formação de EPS (150 horas) a concentração de glicose era de 30 g L<sup>-1</sup>. Portanto, por meio do controle da concentração de glicose dissolvida no meio de cultivo entre 20 e 30 g L<sup>-1</sup>, esperava-se aumentar a concentração de EPS e estender a fase de máxima velocidade de produção de EPS. Contudo, obteve-se neste trabalho valores de concentração máxima e produtividade global em EPS menores (0,87 g L<sup>-1</sup>, 3,78 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) que os obtidos por Wisbeck *et al.* (2005) (1,33 g L<sup>-1</sup> e 7,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente). Assim como descrito por Wisbeck *et al.* (2005), neste trabalho, a partir de 230 horas, observou-se degradação/consumo de EPS. Este fato se deve provavelmente à liberação, neste instante, da enzima β-glucanase para o meio de cultivo, provocada pela aderência dos polissacarídeos à biomassa micelial. Esta camada de polissacarídeos ao redor da biomassa micelial dificulta a transferência do substrato para o interior das células. De acordo com a literatura (BURNS *et al.*, 1994; CAMPBELL *et al.*, 2003; WISBECK *et al.*, 2005; GERN *et al.*, 2008), nestas condições, o fungo sintetiza esta enzima que, ao mesmo tempo em que quebra os polissacarídeos aderidos à biomassa micelial, libera glicose para o meio de cultivo e facilita a entrada da glicose do meio de cultivo para o interior da célula.

Corroborando com esta hipótese, observou-se neste trabalho velocidades médias de consumo de glicose similares nos intervalos de 169 a 217 e de 217 a 264 horas (0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no período de tempo de 0 a 169 horas; 0,14 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no período de tempo de 169 a 217 horas; 0,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no intervalo de 217 a 264 horas; 0,23 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no intervalo de 264 a 304 horas e 0,18 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no intervalo de 304 a 332 horas), assim como estabilização da velocidade de crescimento celular no intervalo de 203 a 250 horas, e retomada do crescimento celular bem como aumento da velocidade média de consumo de glicose no intervalo de 264 a 304

horas, ou seja, após a degradação/consumo do EPS. Esperava-se também, neste intervalo de tempo, a retomada da produção de EPS, porém como a alimentação/pulso foi realizada somente com solução concentrada de glicose, supõe-se que algum dos nutrientes do meio de cultivo pode ter esgotado, pois a composição do meio estava balanceada para concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , conforme proposto por Cavazzoni e Adami (1992). Ao final do quarto pulso de glicose (aproximadamente 332 h) alcançou-se concentração de biomassa micelial de  $12,8 \text{ g L}^{-1}$ . No tempo correspondente à concentração máxima em EPS (230 h), a concentração de biomassa micelial foi de  $6,9 \text{ g L}^{-1}$ . Comparando-se os resultados obtidos por Wisbeck *et al.* (2005) com os obtidos neste trabalho, observou-se concentração e produtividade em EPS 52,9 e 98,4 % superiores quando utilizou-se o processo de cultivo descontínuo simples ao invés do descontínuo com pulsos de glicose para a produção de EPS por *P. ostreatus*.

No entanto, outros basidiomicetos apresentaram comportamento diferente. Tang e Zhong (2002) estudaram o cultivo de *Ganoderma lucidium* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de lactose. Quando a concentração de lactose no meio de cultivo baixou para 10 a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , adicionou-se uma solução concentrada de lactose a fim de se elevar a concentração para  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Após 20 dias de cultivo obteve-se  $0,87 \text{ g L}^{-1}$  de concentração máxima de EPS, aproximadamente 43 % maior que a obtida em processo descontínuo simples. A produtividade máxima em EPS foi de  $1,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

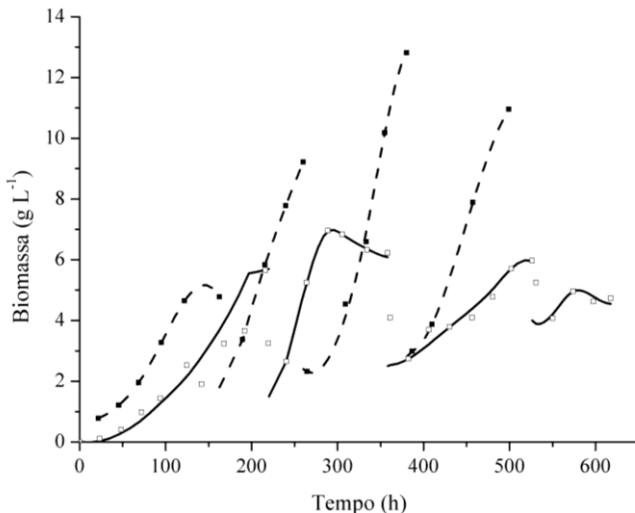
Zou (2006) estudou o cultivo de *Agaricus brasilienses* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de glicose. A adição de uma solução concentrada de glicose foi realizada a cada 24 h, durante o período de 72 a 120 horas, a fim de aumentar a concentração de glicose para  $15 \text{ g L}^{-1}$ , pois em cultivo realizado em processo descontínuo simples, após 72 horas se atinge a metade da fase de máxima velocidade de formação de biomassa micelial e produtos, sendo a concentração residual de glicose neste instante aproximadamente  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Após este período, a glicose foi consumida mais lentamente e após 120 horas se atingiu a fase estacionária de formação de biomassa micelial e produtos. Por meio do processo descontínuo com pulsos de glicose o autor conseguiu aumentar a concentração de EPS em 26,9 % (aproximadamente  $1,67 \text{ g L}^{-1}$ ) em comparação com o processo descontínuo simples. A produtividade em EPS foi de  $11,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  utilizando processo descontínuo com pulsos de glicose.

Shih *et al.* (2008) estudaram o cultivo de *Grifola frondosa* em biorreator em processo descontínuo com pulsos de glicose, pois de

acordo com experimentos realizados anteriormente por estes pesquisadores, em processo descontínuo simples, verificou-se que a fonte de carbono esgotava-se antes que a biomassa micelial e o produto atingissem suas concentrações máximas. Os autores justificaram este fato devido à concentração insuficiente da fonte de carbono no meio de cultivo. Contudo, como é sabido que muitas vezes concentrações elevadas de nutrientes adicionadas no início do cultivo levam a inibição do crescimento celular e formação de produto, os autores optaram por estudar o processo descontínuo com pulsos de glicose. Quando a concentração de glicose atingiu 0,5 % ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), após aproximadamente 6 dias de cultivo, adicionou-se ao meio uma solução concentrada de glicose a fim de elevar a concentração para 1,5 % ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ). A adição de solução de glicose foi realizada por seis vezes (após 6, 7, 9, 9,5, 11 e 12 dias de cultivo). Após 13 dias de cultivo as concentrações de biomassa micelial e EPS foram  $8,23 \text{ g L}^{-1}$  e  $3,88 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente; ou seja, 22,8 % e 17,6 %, respectivamente, superiores às obtidas com o processo descontínuo simples.

### **5.1.2 Cultivo em processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo**

A Figura 9 apresenta as curvas cinéticas de crescimento celular de *P. ostreatus* conduzido em biorreator de bancada, em processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4,0, temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).

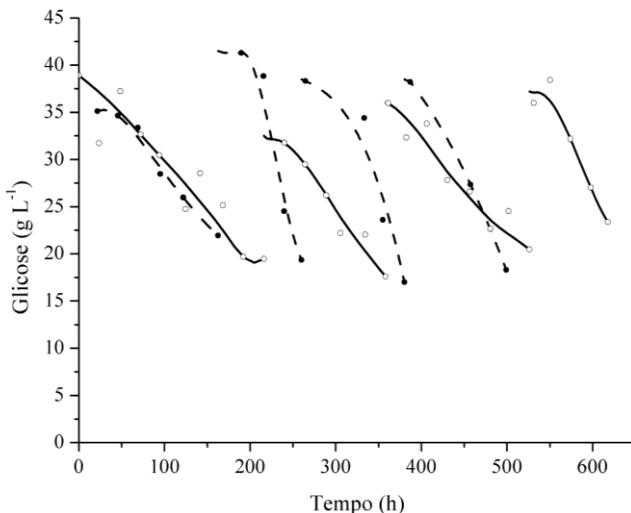


**Figura 9 - Concentração de biomassa micelial em função do tempo (horas) durante o cultivo de *P. ostreatus* em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -□-) e 75 % (linha tracejada, -■-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>, pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> (K<sub>L</sub>a inicial igual a 15 h<sup>-1</sup>).**

Observa-se na Figura 9, menor reprodutibilidade entre os ciclos (ou tempos de residência) no cultivo conduzido com corte de 50 %, assim como, maior tempo para se atingir a concentração máxima de biomassa micelial, em cada ciclo, do que no cultivo conduzido com corte de 75 %. No processo com corte de 75 %, o volume de meio de cultivo repostado a cada início de ciclo foi maior que no processo com corte de 50 %, fazendo com que maior quantidade de nutrientes fosse disponibilizada às células. Além disso, maior quantidade de inibidores e/ou metabólitos tóxicos pode ter sido retirada do meio de cultivo no processo com corte de 75%. Ambos os fatos podem ter ocasionado maiores velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) no processo com corte de 75 % (0,020, 0,021, 0,021, e 0,015 h<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente) do que no processo com corte de 50 % (0,015, 0,017, 0,006, e 0,007 h<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente). A

concentração máxima de biomassa micelial, obtida em cada corte, também foi maior no processo que utilizou corte de 75 % (5,2, 9,2, 12,4 e 10,9 g L<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos) do que no processo que utilizou corte de 50 % (5,7, 7,0, 6,0 e 5,0 g L<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos).

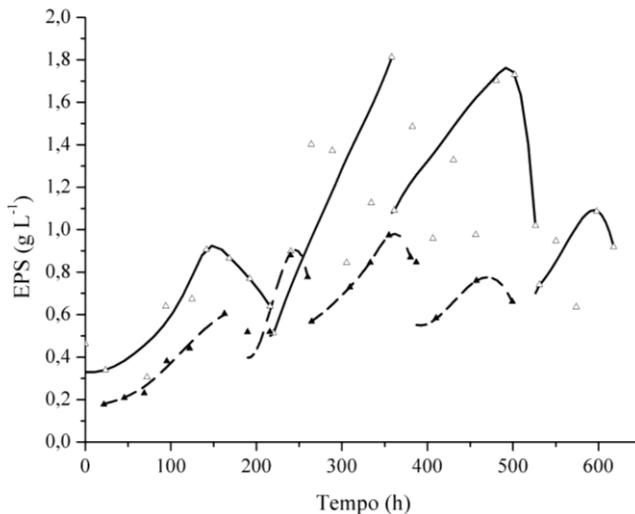
A Figura 10 apresenta as curvas cinéticas de consumo de glicose por *P. ostreatus* para estes experimentos. Derivando-se estas curvas e calculando-se as velocidades médias de consumo de glicose obtêm-se os seguintes valores: 0,097, 0,302, 0,179 e 0,172 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente, do cultivo com corte de 75% e 0,086, 0,121, 0,091 e 0,152 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente, do cultivo com corte de 50%. Observa-se que as velocidades médias são maiores no processo com corte de 75%, fato que pode estar relacionado à facilidade de assimilação do substrato pelas células em meio contendo menor concentração de biomassa micelial por corte, ou seja, no processo com corte de 75 % do volume de meio de cultivo.



**Figura 10 - Concentração de glicose em função do tempo (horas) durante o cultivo de *P. ostreatus* em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -O-) e 75 % (linha tracejada, -●-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>, pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> (K<sub>L</sub>a inicial igual a 15 h<sup>-1</sup>).**

As Figuras 9 e 10 mostram ainda que em ambos os cultivos os primeiros ciclos foram mais longos (163 e 216 horas para os processos com corte de 75 e 50 %, respectivamente), devido ao período de adaptação do microrganismo ao meio e condições de cultivo. Em ambos os casos, no segundo ciclo, como esperado, o microrganismo já se encontrava adaptado e, portanto, os tempos de duração destes ciclos foram menores (70 e 140 horas para os processos com corte de 75 e 50 %, respectivamente). Contrariando as expectativas, os tempos nos ciclos subsequentes foram maiores que no segundo ciclo (116 e 112 horas para o terceiro e quarto ciclos dos cultivos conduzidos com corte de 75 % e 165 e 136 horas para o terceiro e quarto ciclos dos cultivos conduzidos com corte de 50 %), provavelmente devido à aderência dos polissacarídeos à biomassa micelial no decorrer do cultivo, dificultando a transferência da glicose dissolvida no meio de cultivo para o interior da célula.

A Figura 11 apresenta as curvas cinéticas de produção de EPS por *P. ostreatus* para os mesmos experimentos. Observa-se, a partir do segundo ciclo, que no cultivo conduzido com corte de 75 % a concentração máxima de EPS foi atingida em menor tempo que no cultivo conduzido com corte de 50 %. Contudo, menores concentrações do produto foram obtidas no cultivo com corte de 75 % (0,42, 0,51, 0,41 e 0,22 g L<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente) em comparação ao cultivo com corte de 50 % (0,60, 1,30, 0,67 e 0,35 g L<sup>-1</sup> para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente). É possível observar ainda, em praticamente todos os ciclos, o acúmulo de EPS até um determinado tempo de cultivo, em seguida observa-se degradação/consumo do EPS acumulado. Conforme observado anteriormente, isso ocorre provavelmente, devido à síntese e excreção de β-glucanase para o meio de cultivo, a qual quebra os polissacarídeos aderidos à biomassa micelial liberando glicose para o meio de cultivo, facilitando a entrada da glicose dissolvida no meio de cultivo para o interior das células.



**Figura 11 - Concentração de EPS em função do tempo (horas) durante o cultivo de *P. ostreatus* em processo semi-contínuo com cortes de 50 % (linha contínua, -Δ-) e 75 % (linha tracejada, -▲-) do volume de meio de cultivo. Utilizou-se meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>, pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> (K<sub>L</sub>a inicial igual a 15 h<sup>-1</sup>).**

A Tabela 3 apresenta a média dos fatores de conversão de glicose em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ) e de glicose em EPS ( $Y_{P/S}$ ), bem como das produtividades globais em biomassa micelial e EPS (QX e QP, respectivamente), obtidos em cada ciclo. Para os cálculos dos parâmetros cinéticos de cada ciclo utilizou-se as concentrações correspondentes ao tempo em que a concentração de EPS foi máxima (tempo de processo). Observa-se que enquanto o cultivo conduzido com corte de 75 % favoreceu a produtividade em biomassa por *P. ostreatus*, o cultivo conduzido com corte de 50 % favoreceu a produtividade em EPS.

**Tabela 3 - Fatores de conversão de glicose em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ), glicose em EPS ( $Y_{P/S}$ ), e produtividades globais em biomassa micelial (QX) e EPS (QP) obtidas dos cultivos conduzidos em processo semi-contínuo, com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo.**

<b>% de corte do meio de cultivo</b>	<b><math>Y_{X/S}^*</math> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>QX<sup>*</sup> (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>Y_{P/S}^*</math> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>QP<sup>*</sup> (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>
50	0,43	23,37	0,06	6,06
75	0,22	61,02	0,03	4,03

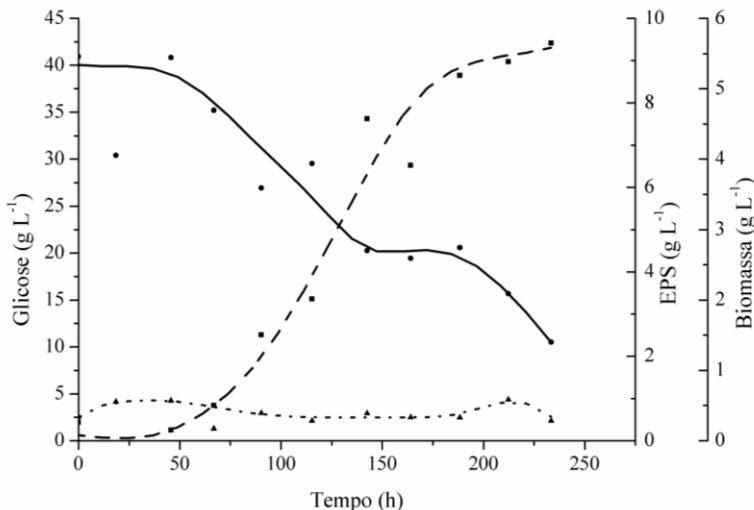
\* Valores médios.

Comparando-se os parâmetros cinéticos fator de conversão de glicose em EPS e produtividade global em EPS obtidos neste trabalho no cultivo conduzido com corte de 50 % (0,06 g g<sup>-1</sup> e 6,06 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) com aqueles obtidos por Wisbeck *et al.* (2005), em processo descontínuo simples (0,08 g g<sup>-1</sup> e 7,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente), conclui-se que o processo descontínuo simples foi mais eficiente na produção de EPS por *P. ostreatus* que o processo semi-contínuo com corte de 50 %. O cultivo em processo descontínuo simples apresentou fator de conversão de glicose em EPS e produtividade em EPS 33,3 e 23,8 %, respectivamente, superiores aos obtidos nos cultivos conduzidos em processo semi-contínuo.

## 5.2 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS) POR *Pleurotus sajor-caju*

### 5.2.1 Cultivo em processo descontínuo simples

Com base nos resultados obtidos com *P. ostreatus*, realizou-se o cultivo de *P. sajor-caju* em processo descontínuo simples, utilizando o mesmo meio e condições de cultivo. A Figura 12 apresenta as curvas cinéticas referentes ao cultivo de *P. sajor-caju* conduzido em biorreator de bancada, em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>, pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> ( $K_L a$  inicial igual 15 h<sup>-1</sup>).



**Figura 12 -** Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada, -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (horas) durante o cultivo de *P. sajor-caju* em processo descontínuo simples, em meio de cultivo POL, concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>, pH 4,0, temperatura 30 °C, velocidade de agitação 300 rpm e vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> (K<sub>L</sub>a inicial igual a 15 h<sup>-1</sup>).

Após 233 horas (aproximadamente 10 dias) o cultivo foi encerrado devido à formação de aglomerados de micélio (“pellets”) muito grandes (Figura 13), provavelmente, devido a não excreção dos polissacarídeos para o meio de cultivo e a aderência destes à biomassa micelial, pois não foi observada variação da concentração de EPS durante todo o cultivo. Este fato impossibilitou a homogeneização do meio de cultivo e a continuidade do experimento. Naquele instante, a concentração residual de glicose era de aproximadamente 11 g L<sup>-1</sup> e a concentração de biomassa micelial de 5,5 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 13 - Vista superior da cuba do biorreator ao final do cultivo de *P. sajor-caju* em processo descontínuo simples, evidenciando a formação de grandes aglomerados de biomassa micelial.**

Burns *et al.* (1994) obtiveram concentração de EPS igual a  $0,29 \text{ g L}^{-1}$ , em cultivo de *P. florida*. Os autores atribuíram a baixa concentração de EPS à dificuldade de transferência de massa causada pela aderência de polissacarídeos aos “pellets” de micélio, assim como sugerido neste trabalho.

Analisando a curva cinética de produção de biomassa por *P. sajor-caju* (Figura 12), observa-se que aproximadamente 50 horas foram necessárias para a adaptação do fungo ao meio e às condições de cultivo. Entre 90 e 160 h, observa-se fase de máxima velocidade de crescimento celular. Após este período a velocidade de crescimento diminui e a concentração de biomassa micelial torna-se máxima e estável. A concentração máxima e as produtividades, global e máxima, em biomassa micelial obtidas foram  $5,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $23,6$  e  $28,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Confortin *et al.* (2008) obtiveram produtividade em biomassa por *P. sajor-caju* igual a  $85 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  utilizando as seguintes condições de cultivo: durante as quatro primeiras horas (metade da fase de máxima velocidade de crescimento celular) a velocidade de agitação foi mantida em 100 rpm e o pH em 6,5; em seguida, o pH foi diminuído para 5,0 e a velocidade de agitação foi aumentada para 250 rpm, a fim de se manter o nível de oxigênio dissolvido acima de 30 %; fixou-se a vazão de ar em  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  e a temperatura em  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supõe-se que tanto o aumento da velocidade de agitação quanto a diminuição do valor de pH contribuíram para diminuir a aderência dos polissacarídeos à biomassa micelial, provavelmente, devido a alteração na morfologia das

células (LEE *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2006; POKHREL & OHGA, 2007).

Neste trabalho, apesar de se ter usado uma linhagem de *P. sajor-caju* diferente da utilizada por Confortin *et al.* (2008), utilizou-se velocidade de agitação igual a 300 rpm e menor valor de pH (4,0). Portanto, não esperava-se a pronunciada aderência dos polissacarídeos à biomassa micelial e a dificuldade de homogeneização do meio, o que provavelmente contribuiu para a não variação da concentração de EPS durante o cultivo. Confortin *et al.* (2008) investigaram a influência das concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja, constituintes do meio de cultivo, sobre a produção de biomassa e EPS por *P.sajor-caju* PS2001. Vários autores realizaram estudo similar, porém utilizando outros fungos (FANG & ZHONG, 2002b; LEE *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2006; LIN & CHEN, 2007; POKHREL & OHGA, 2007; CHEN *et al.*, 2008; HUANG & LIU, 2008; XU *et al.*, 2008). De modo geral, maiores concentrações de EPS são obtidas com menores concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura, bem como com maiores concentrações de peptona de soja.

### **5.2.2 Determinação das concentrações iniciais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja**

Com base no exposto no item 5.2.1., optou-se por avaliar a influência das concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja, presentes no meio de cultivo POL, segundo planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1), sobre a produção de biomassa micelial e EPS por *P. sajor-caju*, em experimentos realizados em frascos agitados.

A Tabela 4 apresenta os efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1), para as concentrações de EPS. Valores negativos expressam que a concentração de EPS aumenta na direção do nível inferior daquela variável e valores positivos expressam que a concentração de EPS aumenta na direção do nível superior daquela variável.

**Tabela 4 - Efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1), com nível mínimo de 95 % de confiança, para as concentrações de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ).**

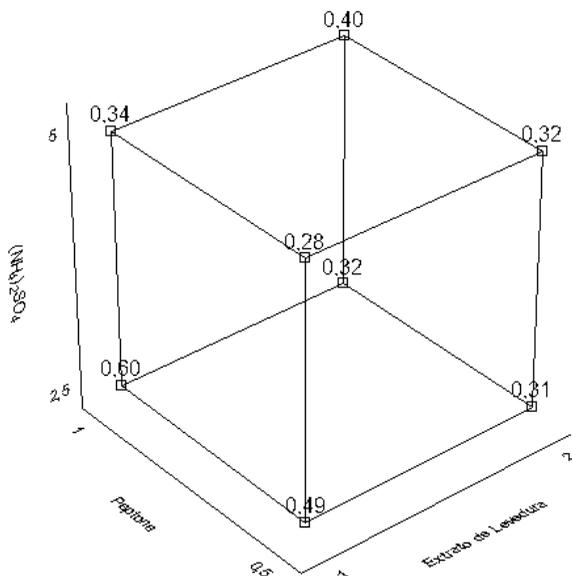
Variáveis	Efeito $\pm$ erro padrão
(1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$-0,097125^* \pm 0,017169$
(2) Extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	$-0,095375^* \pm 0,017169$
(3) Peptona de soja ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0,064875^* \pm 0,017169$
Interação entre (1) e (2)	$0,140125^* \pm 0,017169$
Interação entre (1) e (3)	$0,004375 \pm 0,017169$
Interação entre (2) e (3)	$-0,020875 \pm 0,017169$
Interação entre (1), (2) e (3)	$0,029125 \pm 0,017169$

\* Efeito estatisticamente significativo

Observa-se na Tabela 4 que as concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura apresentaram efeito negativo estatisticamente significativo sobre a concentração de EPS, ou seja, a concentração de EPS aumenta na direção do nível inferior destas variáveis ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 2,5 \text{ g L}^{-1}$  e extrato de levedura =  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Peptona de soja apresentou efeito positivo estatisticamente significativo sobre a concentração de EPS, ou seja, a concentração de EPS aumenta na direção do nível superior desta variável (peptona de soja =  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ).

A Figura 14 apresenta graficamente o efeito das interações entre as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) das variáveis  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS.

Observa-se interação significativa entre as concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura (Tabela 4). Isto é, a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no nível inferior leva a um aumento na concentração de EPS quando a concentração de extrato de levedura também está no nível inferior, sendo este efeito somente visualizado nestas condições (Figura 14). Desta análise verifica-se que para se obter maior concentração de EPS ( $0,60 \text{ g L}^{-1}$ ), levando-se em consideração os efeitos individuais e as interações significativas das variáveis, deve-se utilizar no cultivo as concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura no nível inferior ( $2,5$  e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e de peptona de soja no nível superior ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ), ou seja, as condições do experimento 7 (Tabela 2).



**Figura 14 - Efeito das interações entre as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) das variáveis  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja, sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS por *P. sajor-caju*.**

Rosado *et al.* (2002) avaliaram a influência da concentração inicial de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $5,0$  e  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), em experimentos em frascos agitados contendo meio de cultivo POL, sobre a produção de EPS por *P. ostretoroseus*. A mais alta concentração de EPS ( $9,7 \text{ g ms L}^{-1}$ ) foi obtida com a menor concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), assim como neste trabalho. Lin e Chen (2007) estudaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de EPS por *Antrodia cinnamomea*. Os autores, assim como neste trabalho, observaram efeito positivo estatisticamente significativo para a variável peptona de soja sobre a concentração de EPS. Quando os autores utilizaram  $0,8 \%$  de peptona de soja,  $0,8 \%$  de extrato de levedura e  $0,8 \%$  de extrato de malte obtiveram concentração de EPS igual a  $1,36 \text{ g L}^{-1}$ .

Confortin *et al.* (2008) estudaram diferentes concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja no meio de cultivo, visando à produção de biomassa e EPS por *P. sajor-caju* PS2001. Os autores obtiveram  $8,18 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa micelial e  $1,18 \text{ g L}^{-1}$  de EPS utilizando concentrações de  $1,57 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1,86$

g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 2,4 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja. De acordo com o planejamento fatorial realizado pelos autores, menores concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e extrato de levedura, bem como maiores concentrações de peptona de soja no meio de cultivo, proporcionaram aumento da produção de EPS por *P. sajor-caju* PS2001, o que mais uma vez corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, os autores obtiveram aproximadamente o dobro das concentrações de biomassa micelial e EPS obtidas neste trabalho com o experimento 7 (Tabela 2), utilizando a espécie *P. sajor-caju* CCB 019 (3,95 g L<sup>-1</sup> de biomassa micelial e 0,6 g L<sup>-1</sup> de EPS). Cabe destacar que os autores, além das três fontes de nitrogênio citadas, e da glicose, utilizaram um meio de cultivo mais rico em nutrientes e micronutrientes (20 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0 g L<sup>-1</sup> de CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 3 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,0 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 500 mg L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15,6 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 14 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 20 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>) que o meio de cultivo POL, além da adição de óleo de soja (1 mL L<sup>-1</sup>). Este meio de cultivo enriquecido com minerais, bem como a diferente linhagem de *P. sajor-caju*, podem ter contribuído para a maior produção de EPS e biomassa micelial.

A Tabela 5 apresenta os efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1), para as concentrações de biomassa micelial.

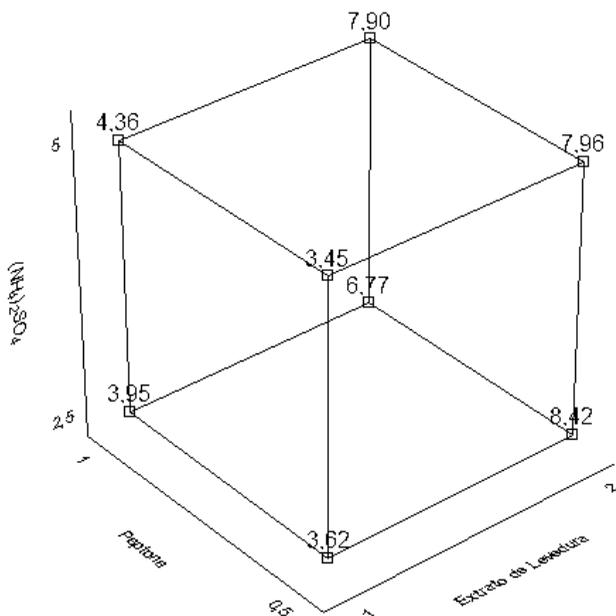
**Tabela 5 - Efeitos calculados através do Teste de Pareto, com base no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1), com nível mínimo de 95 % de confiança, para as concentrações de biomassa micelial (g L<sup>-1</sup>).**

Variáveis	Efeito ± erro padrão
(1) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,227637 ± 0,170871
(2) Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	3,917256* ± 0,170871
(3) Peptona de soja (g L <sup>-1</sup> )	-0,117079 ± 0,170871
Interação entre (1) e (2)	0,111520 ± 0,170871
Interação entre (1) e (3)	0,542204* ± 0,170871
Interação entre (2) e (3)	-0,735986* ± 0,170871
Interação entre (1), (2) e (3)	0,250861 ± 0,170871

\* Efeito estatisticamente significativo

Observa-se na Tabela 5 que a variável extrato de levedura apresentou efeito positivo estatisticamente significativo sobre a concentração de biomassa micelial, ou seja, a concentração aumenta na direção do nível superior desta variável ( extrato de levedura = 2,0 g L<sup>-1</sup>). As variáveis (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e peptona de soja não apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a concentração de biomassa micelial.

A Figura 15 apresenta graficamente o efeito das interações entre as concentrações (g L<sup>-1</sup>) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja, sobre a concentração (g L<sup>-1</sup>) de biomassa micelial.



**Figura 15 - Efeito das interações entre as concentrações (g L<sup>-1</sup>) das variáveis (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e peptona de soja, sobre a concentração (g L<sup>-1</sup>) de *P. sajor-caju*.**

Com relação à interação significativa entre as concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e peptona de soja (Tabela 5) observa-se que a concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no nível inferior leva a um aumento na concentração de biomassa micelial quando a concentração de peptona de soja também está no nível inferior, sendo este efeito somente visualizado nestas

condições (Figura 15). Com relação a interação significativa entre as variáveis extrato de levedura e peptona de soja, observa-se que quando a concentração de extrato de levedura está no nível superior tem-se um aumento na concentração de biomassa micelial, porém este aumento é mais acentuado quando peptona de soja está no nível inferior. Destas análises verifica-se que para se obter maior concentração de biomassa micelial ( $8,42 \text{ g L}^{-1}$ ), levando-se em consideração os efeitos individuais e as interações significativas, deve-se utilizar o meio de cultivo do experimento 6 da Tabela 2, no qual as concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e peptona de soja encontram-se no nível inferior ( $2,5$  e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e extrato de levedura no nível superior ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ).

Comparando-se as concentrações apresentadas nas Figuras 14 e 15, bem como os efeitos apresentados nas Tabelas 4 e 5, observa-se que as concentrações que maximizaram a produção de EPS ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  peptona de soja, experimento 7, Tabela 2), proporcionaram produção de biomassa micelial igual a  $3,95 \text{ g L}^{-1}$ . Esta concentração equivale a apenas 46,9 % da concentração ( $8,42 \text{ g L}^{-1}$ ) obtida com extrato de levedura no nível superior e as demais variáveis no nível inferior do planejamento (experimento 6, Tabela 2). No entanto, deve-se considerar que concentrações menores de biomassa micelial não afetam a homogeneidade do meio de cultivo, portanto não dificultam a transferência de oxigênio e o acesso aos nutrientes durante o cultivo. Contudo, deve-se destacar que a parede celular destes fungos é composta por polissacarídeos (polissacarídeos intracelulares – IPS), que também apresentam ações medicinais. Desse modo, a escolha da composição do meio de cultivo depende do tipo de polissacarídeo que se deseja obter, EPS ou IPS. Se o foco principal do estudo for a obtenção de EPS, como é o objetivo deste trabalho, deve-se optar pelo meio de cultivo utilizado no experimento 7 da Tabela 2 e, se for de IPS, deve-se optar, em princípio, pelo meio de cultivo utilizado no experimento 6 desta mesma tabela e, em seguida, deve-se investigar a concentração de IPS na biomassa fúngica.

A influência da concentração de três diferentes fontes de nitrogênio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e água de maceração de milho) sobre a produção de biomassa por *P. ostreatus* foi estudada por Gern *et al.* (2008). As fontes de nitrogênio orgânicas propiciaram maior concentração de biomassa micelial que a fonte inorgânica. Esta última produziu efeito negativo estatisticamente significativo sobre todos os parâmetros cinéticos relacionados à biomassa micelial. Neste trabalho, porém, não se observou influência estatisticamente significativa de

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sobre a concentração de biomassa de *P. sajor-caju*. Os autores obtiveram os melhores resultados de produção de biomassa por *P. ostreatus* quando utilizaram maiores concentrações de extrato de levedura ( $5 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de  $2 \text{ g L}^{-1}$ ), assim como neste trabalho; sendo a concentração máxima de biomassa micelial igual a  $11,15 \text{ g L}^{-1}$ . Outros autores também estudaram a influência da concentração de extrato de levedura sobre a produção de biomassa por basidiomicetos. Huang e Liu (2008) avaliaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de biomassa por *Grifola umbellata* e obtiveram as maiores concentrações (aproximadamente  $7 \text{ g L}^{-1}$ ) com extrato de levedura. Xu *et al.* (2008), dentre diversas fontes de nitrogênio estudadas, na concentração de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , obtiveram maiores concentrações de biomassa de *Ganoderma lucidum* com peptona de soja e extrato de levedura ( $19,2$  e  $18,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente). Pokhrel e Ohga (2007) também encontraram extrato de levedura como sendo a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biomassa por *Lyophyllum decastes* ( $7,03 \text{ g L}^{-1}$ ). Shih *et al.* (2006) observaram efeito positivo para as seguintes fontes de nitrogênio: extrato de levedura, extrato de malte e milhocina, sobre a produção de biomassa micelial pelo cogumelo *Antrodia cinnamomea*. Os autores obtiveram  $12,5 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa micelial, após 10 dias de cultivo, utilizando qualquer uma das três fontes de nitrogênio na concentração de 3 %. Lee *et al.* (2004) estudaram a produção de biomassa por *Grifola frondosa*, em frascos agitados, e observaram que extrato de levedura propiciou maior concentração ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) quando comparado a  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , peptona de carne e polipeptona. Fang e Zhong (2002b) obtiveram maior concentração de biomassa micelial ( $15,4 \text{ g L}^{-1}$ ) de *Ganoderma lucidum* quando combinaram  $5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura com  $5 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja.

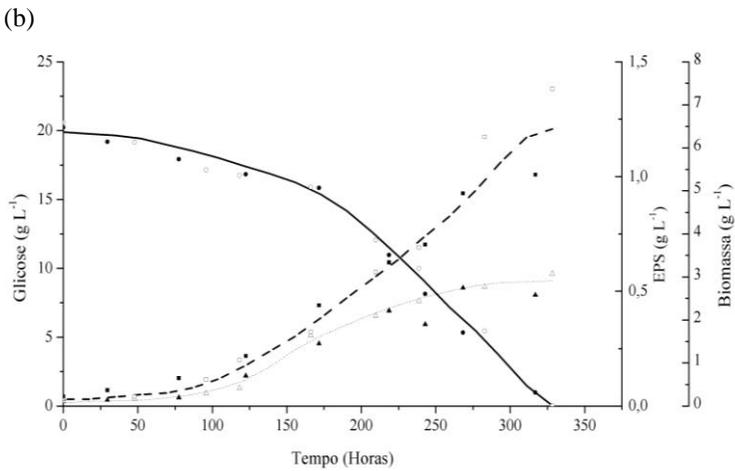
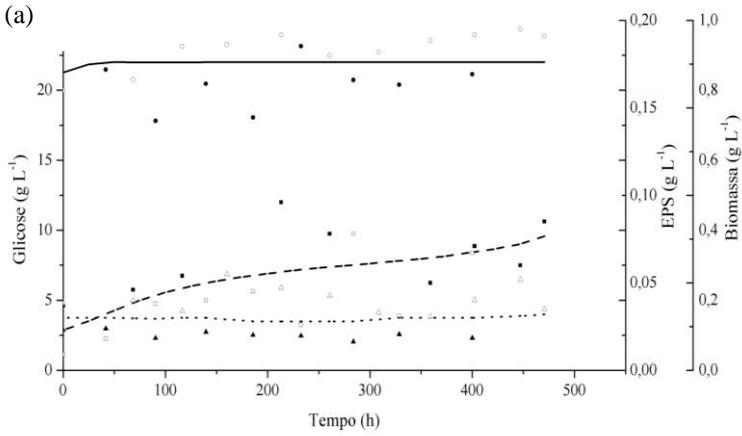
Segundo Chen *et al.* (2008), fontes de nitrogênio orgânicas em comparação com fontes inorgânicas levam a uma maior produção de biomassa micelial e EPS por basidiomicetos, pois aminoácidos essenciais dificilmente são produzidos utilizando-se fontes inorgânicas. Os autores avaliaram a influência das seguintes fontes de nitrogênio sobre a concentração de biomassa por *Fomes fomentarius*:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , uréia, L-lisina, ácido L-aspártico, peptona, triptona, extrato de carne e farelo de casulo do bicho da seda. Dentre estas, farelo de casulo do bicho da seda propiciou a maior concentração de biomassa micelial e de EPS,  $8,16 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,89 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

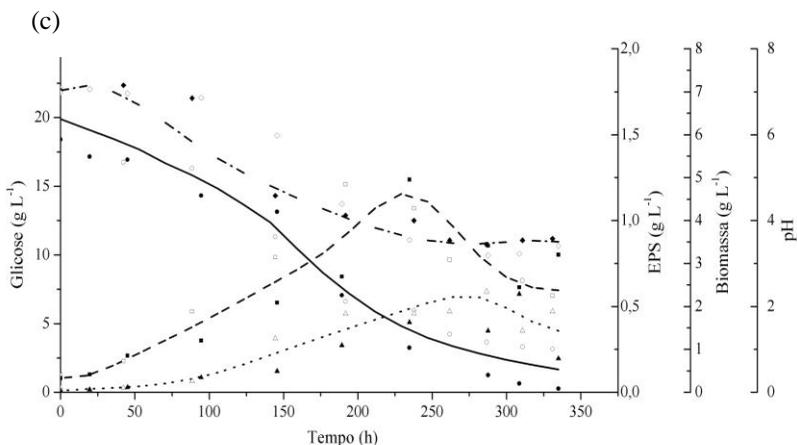
Comparando-se as concentrações de biomassa micelial ( $7,90 \text{ g L}^{-1}$ ) e EPS ( $0,39 \text{ g L}^{-1}$ ) obtidas utilizando-se as concentrações originais do meio de cultivo POL ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja), experimento 1 da Tabela 2, com aquelas obtidas com o experimento 7 da mesma tabela ( $3,95$  e  $0,60 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente), cuja composição foi  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja, observa-se que a concentração de EPS foi maior quando se utilizou este último meio de cultivo. A concentração de EPS foi aumentada em  $53,8 \%$ , sugerindo o aumento da excreção dos polissacarídeos produzidos para o meio de cultivo e, conseqüentemente, a obtenção de “pellets” de micélio menores, garantindo a homogeneidade do meio de cultivo e a possibilidade de condução dos experimentos. Este foi o meio escolhido para continuidade dos experimentos.

### 5.2.3 Determinação do pH de cultivo

A definição do pH ótimo no cultivo submerso de basidiomicetos é um fator muito importante quando se objetiva maximizar a produção de biomassa micelial e EPS. Em função disso, muitos estudos têm sido realizados variando o gênero e a espécie estudada (FANG & ZHONG, 2002a; YANG *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005a; KIM *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2008; BORGES, 2009).

As Figuras 16 a, b e c apresentam as curvas cinéticas referentes aos cultivos de *P. sajor-caju* conduzidos em biorreator de bancada, em pH 3,0, pH 4,0 e pH livre (evolução espontânea), respectivamente, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), com concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , sem adição de  $\text{CaCO}_3$ . A temperatura foi fixada em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a velocidade de agitação em  $300 \text{ rpm}$  e a vazão de ar em  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).





**Figura 16 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em (a) pH 3,0, (b) pH 4,0 e (c) pH livre (evolução espontânea). A Figura 3c mostra também a variação do pH (linha pontilhada e tracejada, -◆-, -◇-) em função do tempo. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.**

Comparando as curvas cinéticas apresentadas nas Figuras 16 a, b e c observa-se que a condução dos experimentos em pH 3,0 inibiu o crescimento e a produção de EPS por *P. sajor-caju*. Os cultivos conduzidos em pH livre (evolução espontânea) apresentaram inicialmente pH 7,0 e, no decorrer do cultivo, este valor foi diminuindo, devido provavelmente à produção e liberação para o meio de cultivo de ácidos orgânicos (FANG & ZHONG, 2002b; TANG & ZHONG, 2002; SHIH *et al.*, 2006), até estabilizar em torno de 3,5, após 230 horas. Os cultivos conduzidos em pH livre e pH 4,0 apresentaram valores de concentração máxima de EPS iguais a 0,55 e 0,53 g L<sup>-1</sup>, respectivamente; sendo as concentrações de biomassa micelial, nos tempos referentes as concentrações máximas de EPS, iguais a 3,52 e 5,52 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Fazendo-se a análise dos dados destes dois cultivos segundo Le Duy Zajic e analisando-se a cinética do processo de acordo com a classificação de Gaden, observou-se que nos cultivos conduzidos em pH 4,0, a síntese de EPS é associada ao crescimento ( $\mu_P = 0,164 \mu$ ). Nos cultivos conduzidos em pH livre a síntese é

parcialmente associada ao crescimento. Neste caso, a produção de EPS foi dissociada do crescimento no início do processo, até 105 h, e associada a partir desse ponto ( $\mu P = 0,124 \mu$ ). Os gráficos encontram-se apresentados no Apêndice B.

As produtividades máximas em biomassa micelial e EPS foram 19,57 e 1,87 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, para os cultivos conduzidos em pH 4,0 e 18,72 e 2,07 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, para os cultivos conduzidos em pH livre. As produtividades globais em biomassa micelial e EPS foram 18,78 e 1,79 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, para os cultivos conduzidos em pH 4,0 e 13,31 e 2,06 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, para os cultivos conduzidos em pH livre. Entretanto, de acordo com Teste de Tukey, com nível de significância de 5 %, nenhum destes parâmetros cinéticos apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as médias das repetições.

Portanto, considerando estas semelhanças e, futuramente, (a) cultivos em escala industrial e (b) adição de CaCO<sub>3</sub> ao meio de cultivo, optou-se pela continuidade dos experimentos em pH 4,0, pois cultivos em valores de pH mais ácidos são menos suscetíveis a contaminações, bem como propiciam a dissociação do CaCO<sub>3</sub>.

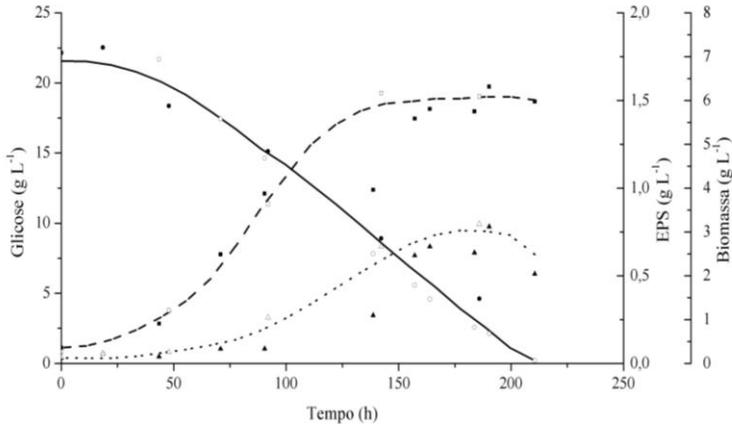
Wisbeck (2005) e Borges (2009) estudaram a influência do pH sobre a produção celular e de EPS por fungos do gênero *Pleurotus*, ambas obtiveram concentrações e produtividades maiores em cultivos conduzidos em valores de pH mais ácidos. Wisbeck (2005), utilizando a espécie *P. ostreatus*, obteve maiores concentrações de biomassa micelial e de EPS (12,8 e 1,33 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) em cultivos conduzidos em pH 4,0 ao invés de 6,0. As produtividades globais em biomassa micelial e EPS foram 36,7 e 7,55 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Borges (2009), utilizando a espécie *P. djamor*, obteve maiores concentrações de biomassa micelial e de EPS (7,11 e 2,11 g L<sup>-1</sup>) em cultivos conduzidos em pH 3,0 ao invés de 4,0. As produtividades máximas em biomassa micelial e EPS foram 32,20 e 11,26 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente. Comparando os valores obtidos neste trabalho com os encontrados por estes autores, pode-se dizer que dentro do mesmo gênero, neste caso, o gênero *Pleurotus*, diferentes condições de cultivo são exigidas para diferentes espécies. No entanto, sabe-se que grande parte dos fungos apresenta pH ótimo ácido (4,0 a 6,0) de crescimento e produção de EPS (FANG & ZHONG, 2002a; HWANG *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008).

Shih *et al.* (2008) avaliaram, em frascos agitados, a influência do pH inicial (4,0 a 6,0) sobre a produção biomassa e de EPS por *Grifola frondosa*. Após 9 dias de cultivo os autores obtiveram concentração

máxima de biomassa micelial ( $2,72 \text{ g L}^{-1}$ ), utilizando pH inicial igual a 4,0, e concentração máxima de EPS ( $0,82 \text{ g L}^{-1}$ ), utilizando pH inicial igual a 5,0. Kim *et al.* (2005a) no cultivo de *Agrocybe cylindracea*, em frascos agitados, obtiveram maior concentração de biomassa micelial ( $9,76 \text{ g L}^{-1}$ ) em pH inicial igual a 4,0. Já, a maior concentração de EPS ( $0,72 \text{ g L}^{-1}$ ) foi obtida utilizando-se pH inicial igual a 6,0. Hwang *et al.* (2003) também obtiveram valores de pH diferentes para produção de biomassa micelial e EPS por *Phellinus linteus*. O valor de pH inicial mais alto (5,0) favoreceu a produção de biomassa micelial (em torno de  $2,8 \text{ g L}^{-1}$ ) e um valor menor de pH inicial (4,0) favoreceu a produção de EPS (em torno de  $1,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Em todos os trabalhos descritos neste parágrafo, após os ensaios em frascos agitados, realizou-se o cultivo em biorreator controlando-se o pH no valor que proporcionou a máxima concentração de EPS.

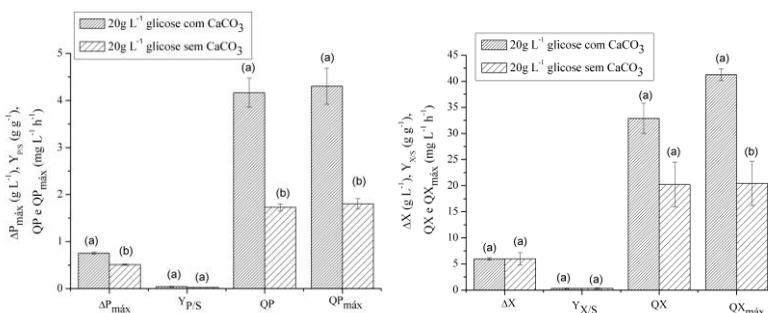
#### 5.2.4 Determinação da adição de $\text{CaCO}_3$ ao meio de cultivo

A Figura 17 apresenta as curvas cinéticas referentes aos cultivos de *P. sajor-caju* conduzido em biorreator de bancada, em processo descontínuo, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), pH 4,0, concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ . A temperatura foi fixada em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a velocidade de agitação em 300 rpm e a vazão de ar em  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_{La}$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figura 17 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.**

De acordo com a Figura 17, observa-se que em 210 horas a glicose foi totalmente consumida. A concentração de EPS (0,72 g L<sup>-1</sup>) atingiu seu valor máximo em 188,4 horas (tempo de processo), sendo a concentração de biomassa micelial neste tempo igual a 5,73 g L<sup>-1</sup>. As produtividades globais em EPS e biomassa micelial foram 3,84 e 30,39 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. A produtividade máxima em EPS (4,22 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi alcançada no tempo de 166,2 horas. A produtividade máxima em biomassa micelial (41,74 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi alcançada no tempo de 121,9 horas. Comparando-se estes valores com os obtidos no cultivo conduzido sem adição de CaCO<sub>3</sub>, observa-se redução no tempo de processo de 55,9 %, aumento da concentração máxima de EPS de 35,8 %, bem como das produtividades, global e máxima, em EPS, de 114,5 % e 125,7 %, respectivamente. Os parâmetros concentração e produtividade global em biomassa micelial, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias das repetições. A produtividade máxima em biomassa micelial foi 113,3 % superior no cultivo conduzido com adição de 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>. A Figura 18 apresenta um comparativo entre os parâmetros cinéticos dos cultivos com e sem CaCO<sub>3</sub>.



**Figura 18 - Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup>, sem e com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>). As barras indicam a média ± desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores dos parâmetros cinéticos significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5 %. ΔP<sub>máx</sub> = variação da concentração de EPS entre o início do cultivo e t<sub>p</sub>, Y<sub>P/S</sub> = fator de conversão de glicose em EPS, QP e QP<sub>máx</sub> = produtividades, global e máxima, em EPS, respectivamente. ΔX = variação da concentração de biomassa micelial entre o início do cultivo e t<sub>p</sub>, Y<sub>X/S</sub> = fator de conversão de glicose em biomassa micelial, QX e QX<sub>máx</sub> = produtividades, global e máxima, em biomassa micelial, respectivamente.**

De acordo com a Figura 17 observa-se ainda que a partir do tempo de 188,4 horas ocorreu um declínio na concentração de EPS, chegando a 0,6 g L<sup>-1</sup> no tempo de 210 horas. Esta queda na concentração de EPS ocorreu, possivelmente, devido aos polissacarídeos estarem aderidos à biomassa micelial, os quais dificultam a entrada da glicose dissolvida no meio para dentro das células, propiciando estabilização da concentração celular. Desta forma, o fungo excretaria para o meio de cultivo β-glicanases a fim de degradar estes polissacarídeos e obter glicose, conforme discutido anteriormente. Contudo, observa-se também que neste momento a concentração de glicose dissolvida no meio de cultivo é muito baixa, sugerindo ainda que o fungo possa estar degradando o EPS para obter glicose.

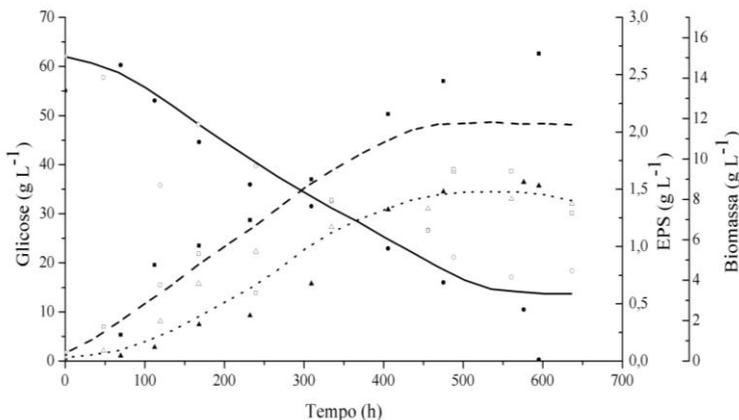
Compostos como CaCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> são frequentemente citados na literatura como elementos minerais capazes de aumentar as

concentrações de biomassa e de metabólitos secundários, como polissacarídeos, produzidos por fungos em cultivos submersos. Hwang *et al.* (2003) obtiveram as maiores concentrações de biomassa e de EPS por *Phellinus linteus* quando adicionaram ao meio de cultivo  $\text{CaCl}_2$ . Xiao *et al.* (2004) e Kim *et al.* (2005b) também obtiveram aumento da concentração de biomassa e de EPS por *Cordyceps jiangxiensis* e *Cordyceps militaris* quando adicionaram ao meio de cultivo  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4$ . Kim *et al.* (2005a), obtiveram as maiores concentrações de biomassa e de EPS por *Agrocybe cylindracea* quando no meio de cultivo encontravam-se os sais  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Segundo Papagianni (2004) e Chardonnet *et al.* (1999), íons  $\text{Ca}^{2+}$  têm importante função no crescimento fúngico, bem como na composição da parede celular destes fungos em termos de polissacarídeos. Normalmente, um gradiente eletroquímico permite a difusão passiva de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula por meio dos canais de proteínas, porém a baixa concentração citoplasmática destes íons é mantida por meio da atividade de bombas  $\text{Ca}/\text{ATPase}$ . Este movimento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana celular gera gradientes internos e externos que favorecem a atividade de algumas enzimas envolvidas na expansão da parede celular e inibem a atividade de enzimas envolvidas na síntese de biopolímeros da parede celular, estimulando a excreção dos polissacarídeos. Desta forma, obtêm-se aumento da produção de EPS e diminuição da produção de polissacarídeos intracelulares (IPS).

A fim de maximizar a produção de EPS por *P. sajor-caju*, optou-se pela continuidade dos experimentos com adição  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) ao meio de cultivo.

### 5.2.5 Determinação da concentração inicial de glicose no meio de cultivo

A Figura 19 apresenta as curvas cinéticas referentes aos cultivos de *P. sajor-caju* conduzidos em biorreator de bancada, em processo descontínuo, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), pH 4,0,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  e concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ . A temperatura foi fixada em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a velocidade de agitação em 300 rpm e a vazão de ar em  $0,25 \text{ L min}^{-1}$  ( $K_L a$  inicial igual a  $15 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figura 19 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa micelial (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), adição de 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> e concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup>. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.**

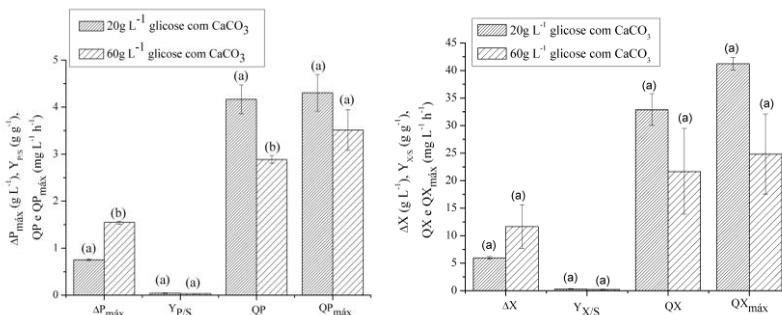
De acordo com a Figura 19, observa-se que após 636 horas, momento em que o cultivo foi interrompido, a glicose ainda não havia sido totalmente consumida, restando 11,4 g L<sup>-1</sup> no caldo de cultivo. Nos cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup> (Figura 17), em 210 horas toda a glicose já havia sido consumida. Comparando-se as velocidades médias de consumo de substrato destes dois experimentos observou-se que a velocidade de consumo de glicose foi menor nos cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> (75 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) que naqueles com 20 g L<sup>-1</sup> (104 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Analisando os dados desses dois cultivos de acordo com Le Duy Zajic e Gaden, observou-se também que, apesar de ambos os cultivos favorecerem o crescimento em detrimento da produção de EPS ( $\mu_P = 0,195 \mu$  e  $\mu_P = 0,846 \mu$  para os cultivos conduzidos com 60 e 20 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), os cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> foram menos favoráveis a produção de EPS que os conduzidos com 20 g L<sup>-1</sup>. Em ambos os cultivos a síntese de EPS foi parcialmente associada ao crescimento, sendo nos cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de 20 g L<sup>-1</sup> a produção dissociada do crescimento até 140 horas de cultivo e associada a partir desse

momento. Nos cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ , a fase dissociada foi até 270 h e a fase associada teve início a partir desse ponto até o final do cultivo. Os gráficos encontram-se no Apêndice B.

Comparando-se os valores de concentração de EPS obtidos neste experimento ( $1,45 \text{ g L}^{-1}$ ), utilizando concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ , com aqueles obtidos por Confortin *et al.* (2008) ( $1,18 \text{ g L}^{-1}$ ) e aqueles obtidos em experimentos conduzidos com concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,72 \text{ g L}^{-1}$ ), observa-se aumento na produção de EPS de 22,9 e 101,4 %, respectivamente. Entretanto, a produtividade global em EPS ( $2,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi inferior à obtida por Confortin *et al.* (2008) ( $12,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e àquela obtida com os cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  ( $3,84 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Então, ainda que os cultivos com concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$  tenham proporcionado a obtenção do dobro da concentração de EPS em relação àquela obtida no cultivo com concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , considerando que o tempo de processo (535,6 horas) foi 2,8 vezes superior ao de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , em período de tempo inferior àquela seria possível a realização de dois cultivos descontínuos sucessivos com concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Considerando-se ainda 24 horas adicionais devido aos tempos mortos entre um cultivo descontínuo e outro, seria possível a obtenção da mesma concentração de EPS ( $1,44 \text{ g L}^{-1}$ ) em aproximadamente 400 horas, ou seja, em aproximadamente 153 horas a menos que no cultivo que utiliza concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ . Além disso, comparando-se os dois cultivos, não há glicose residual nos cultivos iniciados com  $20 \text{ g L}^{-1}$ , bem como, de acordo com análise cinética segundo Le Duy Zajic e Gaden, os cultivos conduzidos com  $20 \text{ g L}^{-1}$  mostraram-se mais favoráveis a produção de EPS. Sabe-se que cultivos descontínuos muito longos apresentam maiores riscos de contaminação, tornando-se inviáveis industrialmente. Portanto, como para a produção em grande escala deve-se maximizar as produtividades e diminuir riscos de contaminação, sugere-se concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de  $60 \text{ g L}^{-1}$  para a produção de EPS por *P. sajor-caju*.

A Figura 20 apresenta um comparativo entre os parâmetros cinéticos dos cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de 20 e  $60 \text{ g L}^{-1}$ . Não observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros concentração, fator de conversão e produtividades, global e máxima, em biomassa micelial.



**Figura 20 -** Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo, conduzidos em pH 4,0, utilizando meio de cultivo POL modificado (experimento 7, Tabela 2), com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) e concentrações iniciais de glicose de 20 e 60 g L<sup>-1</sup>. As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores dos parâmetros cinéticos significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5 %.  $\Delta P_{\max}$  = variação da concentração de EPS entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{P/S}$  = fator de conversão de glicose em EPS, QP e  $QP_{\max}$  = produtividades, global e máxima, em EPS, respectivamente.  $\Delta X$  = variação da concentração de biomassa micelial entre o início do cultivo e  $t_p$ ,  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de glicose em biomassa micelial, QX e  $QX_{\max}$  = produtividades, global e máxima, em biomassa micelial, respectivamente.

Rosado *et al.* (2002) avaliaram a influência da concentração inicial de glicose (30,0 e 60,0 g L<sup>-1</sup>), em experimentos em frascos agitados, sobre a produção de EPS por *P. ostretoroseus*. A mais alta concentração de EPS (9,7 g de massa seca L<sup>-1</sup>) foi obtida com a maior concentração de glicose (60,0 g L<sup>-1</sup>). Da mesma forma, Lee *et al.* (2007) também obtiveram as maiores concentrações de EPS por *Ganoderma applanatum* quando utilizaram maiores concentrações de glicose (60 g L<sup>-1</sup>).

Libardi-Jr *et al.* (2007), ao avaliarem a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por *P. sajor-caju* CCB019, em experimentos realizados em frascos agitados, obtiveram as maiores concentrações de biomassa micelial e EPS (18,37 e 1,16 g L<sup>-1</sup>) utilizando concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> ou 80 g L<sup>-1</sup>. Wisbeck *et al.* (2005), em processo descontínuo, utilizando meio de cultivo POL com CaCO<sub>3</sub> e

concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup> ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>, para o cultivo de *P. ostreatus*, obtiveram concentração máxima e produtividade global em EPS iguais a 1,33 g L<sup>-1</sup> e 7,55 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Borges (2009), em processo descontínuo, utilizando meio de cultivo POL com CaCO<sub>3</sub> e concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup> ao invés de 50 g L<sup>-1</sup>, para o cultivo de *P. djamor*, obteve concentrações máximas de biomassa micelial e EPS iguais a 7,11 g L<sup>-1</sup> e 2,11, respectivamente, bem como produtividades máximas em biomassa micelial e EPS iguais a 32,20 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 11,26, respectivamente.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho, realizado com a espécie *P. sajor-caju* CCB019, com aqueles obtidos por Wisbeck *et al.* (2005), para a espécie *P. ostreatus*, e por Borges (2009), para a espécie *P. djamor*, observa-se menores valores de concentração e produtividades em EPS para a espécie *P. sajor-caju*. Entretanto, polissacarídeos produzidos por esta espécie parecem apresentar maior atividade antitumoral, pois em experimentos realizados por Assis (2011) polissacarídeos extracelulares obtidos do caldo de cultivo de *P. sajor-caju* CCB019 apresentaram maior taxa de redução (86 %) no número de células neoplásicas (de tumor ascítico de Ehrlich), inoculadas em camundongos, que polissacarídeos extracelulares extraídos do caldo de cultivo de *P. ostreatus* (76 %), investigados por Wolff *et al.* (2008). Este fato justifica a busca pela maximização da produção de EPS por *P. sajor-caju* CCB019.

## 6. CONCLUSÕES

O processo descontínuo com pulsos de glicose não se mostrou mais eficiente que o processo descontínuo simples para a produção de EPS por *Pleurotus ostreatus*. Com relação ao processo semi-contínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de meio de cultivo, obteve-se maior produtividade global em biomassa micelial ( $61,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) quando utilizou-se percentual de corte de 75% e maior produtividade global em EPS ( $6,06 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) quando utilizou-se percentual de corte de 50%. Comparando-se a produtividade global em EPS, obtida com o cultivo conduzido com corte de 50 %, com a obtida por Wisbeck *et al.* (2005), em processo descontínuo simples ( $7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), conclui-se que o processo descontínuo simples foi mais eficiente para a produção de EPS por *Pleurotus ostreatus* que o processo semi-contínuo.

Com relação a influência das concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja sobre a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju*, observou-se que menores concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura ( $2,5$  e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente), bem como maior concentração de peptona de soja ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) proporcionaram concentração de EPS 54% superior à obtida com meio de cultivo POL, comumente recomendado para este tipo de processo. Além disso, melhor homogeneização do meio de cultivo foi obtida devido à menor formação de “pellets”.

Os cultivos conduzidos em pH 3,0 inibiram o crescimento micelial e a produção de EPS por *Pleurotus sajor-caju*. Os cultivos conduzidos em pH 4,0 e pH livre (evolução espontânea), apresentaram concentrações e produtividades, globais e máximas, em biomassa micelial e EPS, similares. Contudo, nos cultivos conduzidos em pH 4,0, a síntese de EPS é associada ao crescimento micelial ( $\mu\text{P} = 0,164 \mu$ ). Considerando futuramente cultivos em escala industrial e adição de  $\text{CaCO}_3$  ao meio de cultivo, sugere-se a condução dos cultivos em pH 4,0 pelo fato de que valores de pH mais baixos são menos suscetíveis a contaminações e propiciam a dissociação deste composto.

A presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de cultivo foi fundamental para a produção de EPS. Obteve-se, além da redução no tempo de processo em 56%, aumento de 35,8% na concentração máxima de EPS e de 114,5% e 125,7% nas produtividades, global e máxima, em EPS, respectivamente, quando adicionou-se ao meio de cultivo  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ .

Com relação a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS, os cultivos que utilizaram concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  proporcionaram valores menores de concentração de EPS ( $0,72 \text{ g L}^{-1}$ ), porém propiciaram valor de produtividade global 42% superior à obtida com os cultivos conduzidos com concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ . Além disso, não há glicose residual nos cultivos iniciados com  $20 \text{ g L}^{-1}$ , bem como, de acordo com análise cinética segundo Le Duy Zajic e Gaden, estes cultivos mostraram-se mais favoráveis a produção de EPS ( $\mu\text{P} = 0,195 \mu$  e  $\mu\text{P} = 0,846 \mu$  para os cultivos conduzidos com  $60$  e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial, respectivamente). Portanto, sugere-se utilizar a concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

## PERSPECTIVAS

- Validação de atividades medicinais como antiviral, antitumoral, antimicrobiana, dentre outras, de polissacarídeos obtidos do caldo de cultivo de *P. sajor-caju* e compará-las com a de polissacarídeos obtidos da biomassa micelial e/ou de corpos de frutificação; assim como com a de polissacarídeos produzidos por outros basidiomicetos.
- Avaliação da citotoxicidade destes polissacarídeos sobre células saudáveis de diferentes linhagens.
- Extração, purificação e caracterização da estrutura química tanto de polissacarídeos extra como intracelulares produzidos por *P. sajor-caju* e de comprovada atividade medicinal.



## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. Cinética de fermentaciones. In: Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2002.
- ARORA, D.S.; SHARMA, R.K.; CHANDRA, P. Biodelignification of wheat straw and its effect on in vitro digestibility and antioxidant properties. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 352 – 358, 2011.
- ASSIS, I. S. Síntese e Avaliação *in vivo* de substâncias bioativas de *Pleurotus sajor-caju*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE, Joinville, 2011.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.25, p.29-42, 2004.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Editora da Unicamp. 2a Edição. Campinas. 1996.
- BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. *Nahrung-Food*, v. 40, n.4, p. 222- 224, 1996.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3) β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v.28, p.3-14, 1995.
- BONATTI, M. Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agro-industriais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus streatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B. *Cogumelos comestíveis*. Ed. Ícone, São Paulo. 1995.

BORCHERS, A.T.; KRISHNAMURTHY, A.; KEEN, C.L.; MEYERS, F.J.; GERSHWIN, M.E. The Immunobiology of Mushrooms. *Experimental Biology and Medicine*, v. 233, p. 259 – 276, 2008.

BORGES, G. *Produção de polissacarídeos extracelulares de potencial antitumoral por “Pleurotus djamor” Univille 001 em processo descontínuo*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2009.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: Fundamentos*. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, v. 1, 2001a.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, v. 1, 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BURNS, P.J. *Characterization of an extracellular polysaccharide from Pleurotus florida*. Ph.D. Thesis - University of Westminster, London, 1993.

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

CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A.; BANYNS, V.L.; DIAS, E.S.; SANTOS, J. Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil do algodão como substrato. *Ciênc. Agrotec.*, v. 31, n. 5, p. 1286-1290, 2007.

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelia edible mushrooms. *Ital. J. Food Sci.*, n.1, p.9-15, 1992.

CHARDONNET, C.O.; SAMS, C.E.; CONWAY, W.S. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 967 – 973, 1999.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -D-(1/3), (1/6)-glucans. *Mycological Research*, v.III, p.635-652, 2007.

CHEN, W.; ZHAO, Z.; CHEN, S.; LI, Y. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresource Technology*, v.99, p.3187-3194, 2008.

CHO, E. J.; OHA, J. Y.; CHANGB, H. Y.; YUN, J. W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, v.127, p.129-140, 2006.

CONFORTIN, F. G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A. J. P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.35, p.1149-1155, 2008.

CUI, J.; CHISTI, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, v.21, p.109-122, 2003.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 160, n. 8, p. 2265-2274, 2010.

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

FANG, Q.; ZHONG, J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, v.37, p.769-774, 2002a.

FANG, Q.; ZHONG, J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic. *Biochemical Engineering Journal*, v.10, p.61-65, 2002b.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and Environmental conditions on the production of exopolysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT - Food Science and Technology*, v.40, p.30-35, 2007.

FENG, YI-LI; LI, WEI-QI; WU, XUE-QIAN; CHENG, JUN-WEN; MA, SU-YUN. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 104–112, 2010.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semin.: Ciências Agrárias, Londrina*, v.30, p.117-134, 2009.

FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, p.689-692, 1997.

FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, B.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. Possibilities of *Pleurotus* applications in food, health and environmental technologies. In: *Current topics on Bioprocesses in Food Industry*. Nova Delhi: Asiatech, p. 482-495, 2008.

GERN, R. M. M. *Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por 'Pleurotus ostreatus' DSM 1833 em cultivo submerso*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 156 p., 2005.

GERN, R. M. M.; WISBEK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, v. 99, p.76-82, 2008.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v.42, p.577-587, 2009.

HEARST, R.; NELSON, D.; McCOLLUM, G.; MILLAR, B. C.; MAEDA, Y. GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; RAO, J. R.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. v.15, p.5-7, 2009.

HUANG, H.; LIU, Y. Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v.39, p.307-311, 2008.

HWANG, H.; KIM, S.; CHOI, J.; YUN, J. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p.309-319, 2003.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.10. p.228–234, 2009.

JIAO, A. Y.; CHEN, B. Q.; ZHOU, C. J.; ZHANG, B. H.; CHEN, D. H. Improvement of exo-polysaccharides production and modeling kinetics by *Armillaria luteo-virens* Sacc. in submerged cultivation. *LWT - Food Science and Technology*, v.41, p.1694-1700, 2008.

JUNG, H.Y.; BAE, I.Y.; LEE, S.; LEE, H.G. Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 1291–1295, 2011.

KANG, S. W. What is oyster mushroom. In: Part II. Oyster Mushrooms. *Mushroom Growers' Handbook*, 2004.

KIM, H. O.; LIM, A. J. M.; JOO, A. J. H.; KIM, S. W. A.; HWANG A, J. W. CHOI, B.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*, v.96, p.1175-1182, 2005a.

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

KIM, H. M.; PARK, M. K.; YUN, J.W. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.134, p.249, 2006.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, v.244, p.61-70, 2006.

LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y. Bistage Control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma Zucidum* in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.88, p.646-650, 1999.

LEE, B. C.; BAEA, J. T.; PYOA, H. B.; CHOEB, T. B.; KIMC, S. W.; HWANGC, H, J.; YUNC, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.369-376, 2004.

LEE, W. Y.; PARK, Y.; AHN, J. K.; KA, K, H.; PARK, S. Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.249–254, 2007.

LIBARDI-Jr, N.; WISBECK, E.; BONATTI-CHAVES, M.; FURLAN, S. A. Estudo cinético da produção de exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados. *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM*, Curitiba-PR, 2007.

LIN, E.; CHEN, Y. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology*, v.98, p.2511–2517, 2007.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JULICH, W. D. The Pharmacological Potential of mushroom. *eCAM*, 2 (3), 285-299, 2005.

LOMBERH, M. L.; SOLOMKO E. F.; BUCHALO A. S.; KIRCHHOFF, B. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. *The 4th ICMBMP*, 2002.

LUO, J.; LIU, J.; KE, C.; QIAO, D.; YE, H.; SUN, Y.; ZENG, X. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* Pilát in submerged culture and the immuno-stimulating activity of exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, n. 3, p. 409-415, 2009.

MAITI, S.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; KUMAR, A.; KHADGI, N.; MAITI, T. K. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.26, p.187-191, 2008.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. b-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*, v.658, p.54-161, 2008.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, v.73, p.321-325, 2001.

MANZI, P.; MARCONI, S.; AGUZZI, A. PIZZOFERRATO L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, v.84, p.201–206, 2004.

MAZIERO, R. *Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: “Screening”, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr)Fr*. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1996.

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

McNEIL, B.; HARVEY, L. M. *Viscous fermentation products. Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, n. 4, 30 p., 1993.

MDACHI, S. J. M.; NKUNYA, M. H. H.; NYIGO, V. A.; URASA, I. T. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*, v.86, p.179–182, 2004.

MIZUNO T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1, p. 9-29, 1999.

MONTEIRO, C.M.A., WISBECK, E., FURLAN, S.A. Obtenção do melhor tempo para produção de exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor caju* em frascos agitados. *Caderno de Iniciação à Pesquisa*, vol. 8, p.719-722, 2006.

MOONMOON, M.; UDDIN, N.; AHMED, S.; SHELLY, N.J.; KHAN, A. Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 17, n. 4, p. 341-345, 2010.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, v.7, p.701–724, 2007.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN E.; VILLARES A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, v. 128, p. 674–678, 2011.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Bioyechnology Advances*, v. 22, p.189-259, 2004.

PAPINUTTI, L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1941–1946, 2010.

PÉREZ-GUISADO, J. Argumentos a favor de la incorporación de los  $\beta$ -D-glucanos a la alimentación. *Endocrinol Nutr.*, v.54, n. 6, p.315-324, 2007.

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

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v. 2, 2002.

RAGUNATHANA, R.; SWAMINATHANB, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chemistry*, v.80, p.371–375, 2003.

RANZANI, M.R.T.C.; STURION, G.L. Avaliação da composição de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 16, p. 339-348, 1998.

RAVEN, P. H., *et al.* *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN, 2001.

REMIÃO, J. O.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, A.M.P. *Bioquímica. Guia de aulas práticas*. EDIPUCRS: Porto Alegre. 214 p., 2003.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's Q parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 139-146, 1991.

ROSADO, F.R., CARBONERO, E.R., KEMMELMEIER, C., TISCHER, C.A., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1 4)-linked -D-galactan and -Dmannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *FEMS Microbiology Letters*, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; COSTA, S.M.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. *Journal Basic Microbiology*, vol. 43, p.230–237, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, V.M.C.S. *Contribuição ao estudo da produção de Pleurotus spp. em resíduos lignocelulósicos*. Dissertação de Mestrado - Programa de Pósgraduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO E. R.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A gel-forming b-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, v. 343, p.1456-1462, 2008.

SARANGI, I.; DIPANJAN, G.; SUJIT, K. B.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*, v.6, p.1287-1297, 2006.

SCHEPETKIN, I. A.; MARK, T. Q. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, v.6, p.317-333, 2006.

SCHNEIDER, I.; KRESSEL, G.; MEYER, A.; KRINGS U.; BERGER, R.G.; HAHNA, A. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, v. 3, p. 17 – 24, 2011.

SHER, H.; AL-YEMENI, M.; BAHKALI, A.H.A.; SHER, H. Effect of environmental factors on the yield of selected mushroom species growing in two different agro ecological zones of Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 17, p. 321–326, 2010.

SHIH, I.; KELLY, P.; CHIENYAN, H. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, v.41, p.1129-1135, 2006.

SHIH, A. I.; CHOU B, B.; CHEN C, C.; WU B, J.; HIS, B. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*, v.99, p.785-793, 2008.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, v.29, p.85-92, 2006.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, F.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, v.597, p.86-91, 2008.

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, v.100, p.983-986, 2009.

SUSEEM, S.R.; MARY, S.; NEELAKANDA, R.; MARSLIN, G. Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous extracts of *Pleurotus eous* mushroom. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 117-120, 2011.

TANG, Y.; ZHONG, J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.20-28, 2002.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides *Carbohydrate Research*, v.341, p.2261-2269, 2006.

TAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, n. 2, p. 109-115, 2009.

TELLES, C.B.S.; SABRY, D.A.; ALMEIDA-LIMA, J.; COSTA, M.S.S.P.; MELO-SILVEIRA, R.F.; TRINDADE, E.S.; SASSAKI, G.L.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A.; LEITE, E.; ROCHA, H.A.O. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, in press, 2011.

THANGAPAZHAM R. L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R. K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS journal*, v. 8, n. 3, E443-9, 2008.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L. JIANG, R.; SUN, D. T. X. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, v.100, p.1682-1686, 2009.

TORO, G. V.; VEGA, R. C.; AGUILAR, M. E. G.; LARA, H. L. L. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. *Food Chemistry*, v.94, p.494-497, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRINDER, R. *Ann. Clin. Biochem.* In: CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E, 1969.

TSAI, S. Y.; HUANG, S. J.; LO, S. H.; WUC, T. P.; LIAN, P. Y.; MAUC, J. L. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, v.113, p.578-584, 2009.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.275, p.810-816, 2000.

WISBECK, E., ROBERT, A.P., FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 3, n.2, p. 07-10, 2002.

WISBECK, E. Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E. ; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 6, p. 19-22, 2005.

WOLFF, E. R. S.; WISBECK, E.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; PINHO, M. S. L.; FURLAN, S. A. Antimicrobial and Antineoplastic Activity of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol.*, v.151, p. 402-412, 2008.

WONG, S. M.; WONG, K.K.; CHIU, L. C. M.; CHEUNG, C. K. Non-starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium* inhibited the growth of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction. *Carbohydrate Polymers*, v.68, p.206-217, 2007.

WONG, J. Y.; CHYE, F. Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.269-277, 2009.

WONG, KA-HING; LAI, C.K.M.; CHEUNG, P.C.K. Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 150 – 158, 2011.

WU, J.; DING, Z. Y.; ZHANG, K. C. Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 743 – 749, 2006.

XIAO, J.; DAI-XIONG CHEN, D.; WAN, W.; HU, X.; QI, Y.; LIANG, Z. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochemistry*, v.41, p.1887-1893, 2004.

XIAO, J.; DAI-XIONG CHEN, D.; WAN, W.; HU, X.; QI, Y.; LIANG, Z. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochemistry*, v.41, p.1887-1893, 2006.

XU, P.; DING, Z.Y.; QIAN, Z.; ZHAO, C.X.; ZHANG, K.C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 325–331, 2008.

YANG, F.; LIAU, C. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, v.33, p.547-553, 1998.

YANG, F.; HUANG, H.; YANG, M. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p.395-402, 2003.

YANG, L.; ZHANG L-M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, v.76, p.349-361, 2009.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J.R.H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: *Tropical Mushrooms*. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. 493p, p. 277-278, 1984.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C.; ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal  $\beta$ -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydrate Research*, v.339, p.2297-2301, 2004a.

ZHANG, M.; CHEUNGA, P. C. K.; ZHANG, L.; CHIU, C. M.; OOI, V. E. C. Carboxymethylated  $\beta$ -glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers*, v.57, p.319-325, 2004b.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; CHIU, L. C. M.; WONG, E. Y. L.; OOI, V. E. C. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated  $\beta$ -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, v.66, p.455-462, 2006.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WNAG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p.4-19, 2007.

ZHANG, MEI.; ZHU, L.; CUI, S.W.; WANG, Q.; ZHOU, T.; SHEN, H. Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus geesteranus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 5-12, 2011.

ZOU, X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, v.41, P.970-974, 2006.



## **APÊNDICE A**

**CURVAS CINÉTICAS REFERENTES AO CULTIVO DE *P. sajor-caju* EM BIORREATOR – CULTIVOS 1 E 2.**



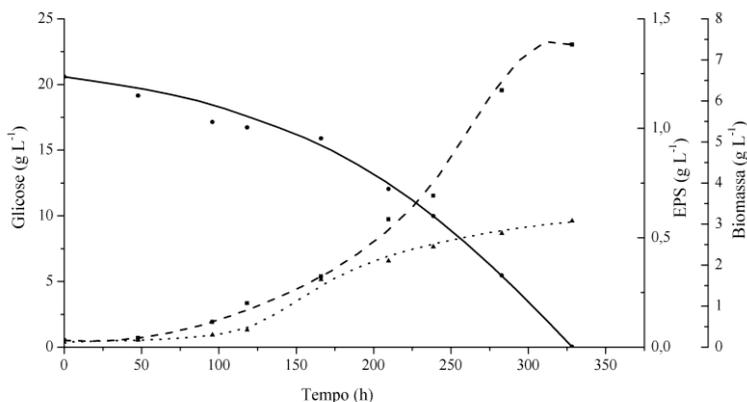


Figura A.1 - Concentrações de glicose (linha contínua, ●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido em pH 4,0 – Cultivo 1.

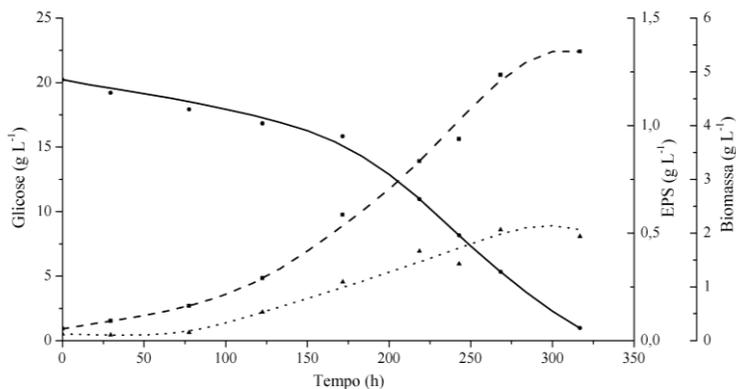


Figura A.2 - Concentrações de glicose (linha contínua, ●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido em pH 4,0 – Cultivo 2.

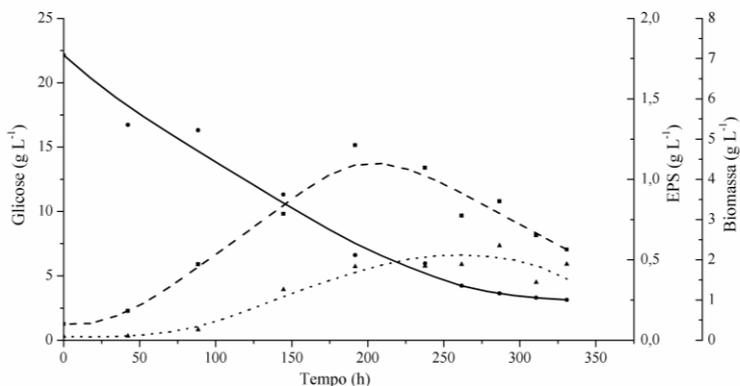


Figura A.3 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido em pH livre (evolução espontânea) – Cultivo 1.

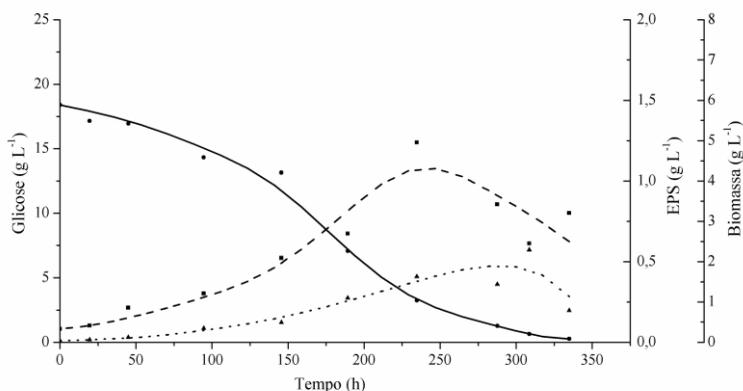


Figura A.4 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido em pH livre (evolução espontânea) – Cultivo 2.

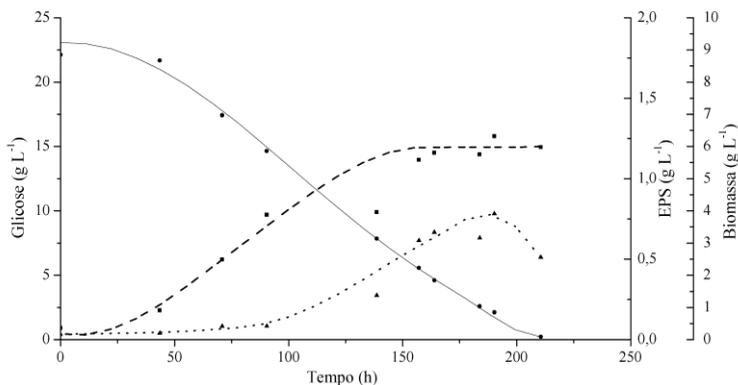


Figura A.5 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido com adição de CaCO<sub>3</sub> 1,0 g L<sup>-1</sup> ao meio de cultivo – Cultivo 1.

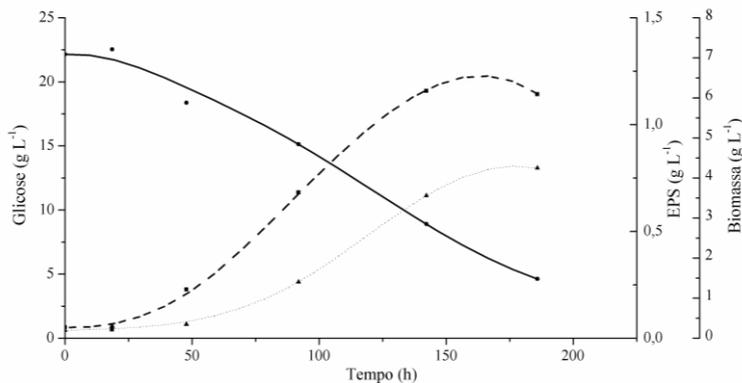


Figura A.6 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido com adição de CaCO<sub>3</sub> 1,0 g L<sup>-1</sup> ao meio de cultivo – Cultivo 2.

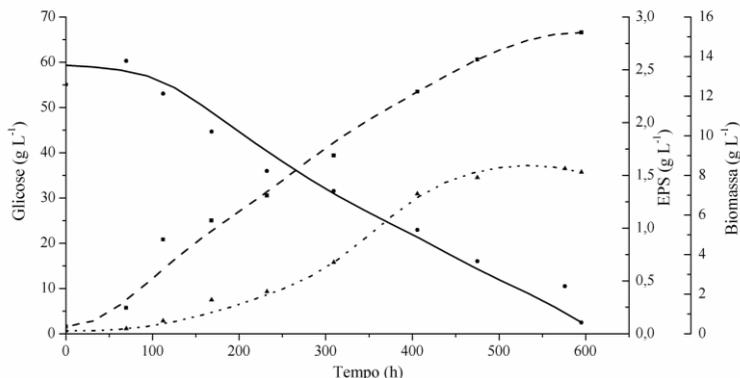


Figura A.7 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido com concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> – Cultivo 1.

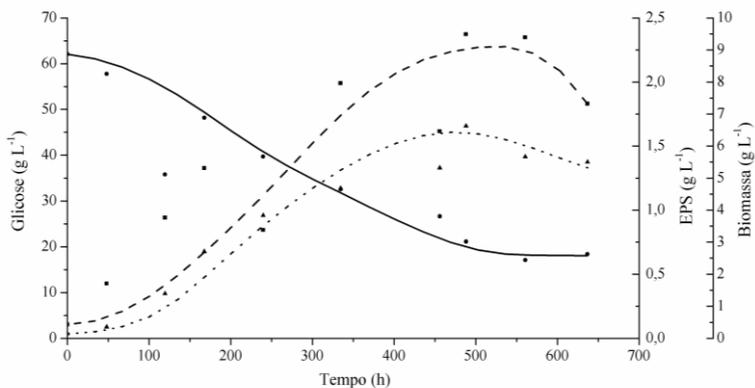


Figura A.8 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-), biomassa micelial (linha tracejada -■-) e EPS (linha pontilhada, -▲-) em função do tempo (h) durante o cultivo de *P. sajor-caju*, conduzido com concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> – Cultivo 2.

## **APÊNDICE B**

**GRÁFICOS REFERÊNTES AO ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO CRESCIMENTO A PRODUÇÃO DE EPS POR *P. sajor-caju* EM PROCESSO DESCONTÍNUO SIMPLES.**



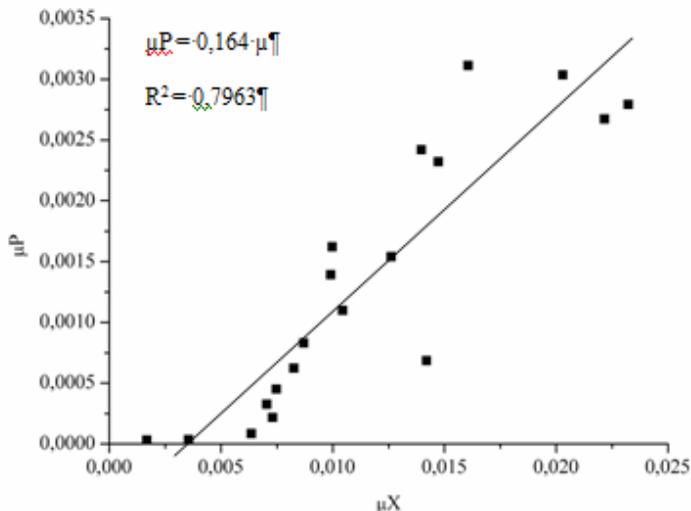


Figura B.1 - Relação entre crescimento celular ( $\mu X$ ) e formação de produto ( $\mu P$ ) para o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, conduzido em pH 4,0.

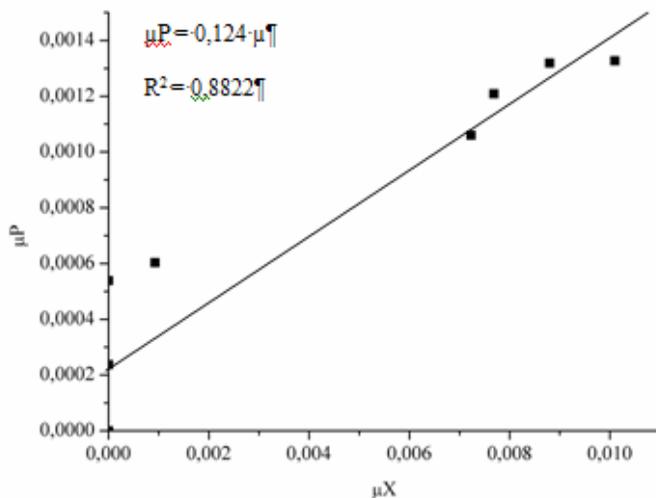


Figura B.2 - Relação entre crescimento celular ( $\mu X$ ) e formação de produto ( $\mu P$ ) para o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, conduzido em pH livre.

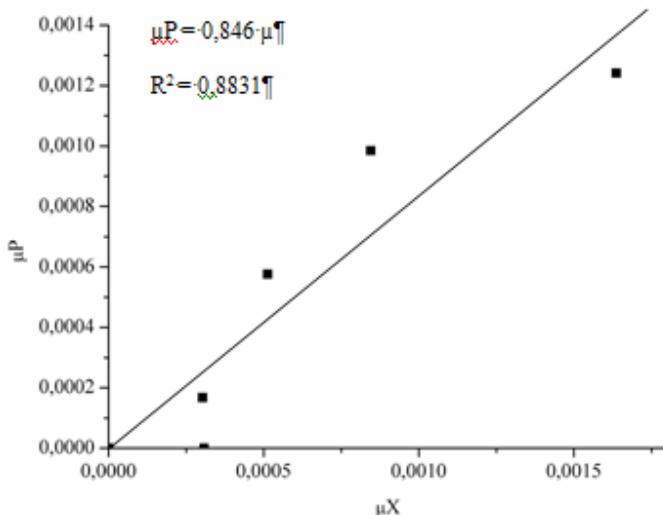


Figura B.3 - Relação entre crescimento celular ( $\mu X$ ) e formação de produto ( $\mu P$ ) para o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, conduzido em pH 4,0, com adição de  $\text{CaCO}_3$   $1,0 \text{ g L}^{-1}$ .

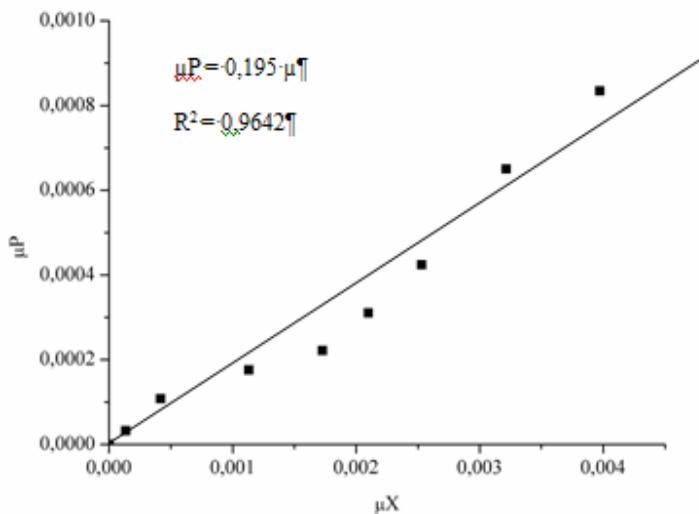


Figura B.4 - Relação entre crescimento celular ( $\mu X$ ) e formação de produto ( $\mu P$ ) para o cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, conduzido em pH 4,0, com adição de  $\text{CaCO}_3$   $1,0 \text{ g L}^{-1}$  e concentração inicial de glicose de  $60 \text{ g L}^{-1}$ .