

Universidade Federal de Santa Catarina
Pós-Graduação em Engenharia Química
Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de
Alimentos

**Estudo de Meios de Cultivo para Produção
de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus*
ostreatus DSM 1833 em cultivo submerso**

Trabalho apresentado como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Química na
Universidade Federal de Santa Catarina.,
Florianópolis, SC, Brasil.

Regina Maria Miranda Gern

Florianópolis, dezembro de 2005.

TERMO DE APROVAÇÃO

Resumo

Entre os fungos pertencentes à classe dos basidiomicetos, os do gênero *Pleurotus* são reconhecidos por apresentar β -glicanos com importantes propriedades medicinais como constituintes da parede celular tanto do basidioma como do micélio. Este trabalho propôs a busca de um meio de cultivo que maximizasse tanto a produção de biomassa como a de polissacarídeos produzidos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. A avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada, utilizando dois diferentes valores de K_L inicial e a avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da biomassa e do caldo de cultivo de *P. ostreatus* cultivado no meio selecionado, também foram realizadas. Os experimentos para a seleção do meio de cultivo foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo a ser estudado, incubados a 30°C, sob agitação recíproca de 120 min⁻¹. Inicialmente, três meios de cultivo foram avaliados: meio POL (20 g.L⁻¹ de glicose, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, sulfato de magnésio e fosfato de potássio), meio TD (extrato de trigo e 20 g.L⁻¹ de glicose) e meio POL-MIL (meio POL modificado pela substituição do extrato de levedura e peptona por água de maceração de milho). A produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) alcançada nestas condições foi de 0,63, 1,48 e 1,16 g.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente para os meios POL, TD e POL-MIL. Por apresentar maior produtividade em biomassa o meio TD foi considerado mais propício para dar continuidade aos experimentos para a escolha da concentração da fonte de carbono. Quando 5, 10, 15 e 20 g.L⁻¹ de glicose foram adicionadas ao extrato de trigo, verificou-se uma produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) de aproximadamente 0,39, 0,64, 0,59 e 1,48 g.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foram de 0,40, 0,63 e 0,88 g.g⁻¹ para os meios POL, TD e POL-MIL, respectivamente. Para as concentrações de glicose de 5, 10, 15 e 20 g.L⁻¹ os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foram de 0,55, 0,54, 0,58 e 0,63 g.g⁻¹ respectivamente. Os resultados de produtividade apontaram o extrato de trigo, adicionado de 20 g.L⁻¹ de glicose, como sendo o mais propício para produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* dentre as condições avaliadas. O bom desempenho alcançado por um meio composto de extrato de trigo e glicose levaram a um experimento subsequente no qual construiu-se um planejamento fatorial 2⁴ para avaliar a suplementação do extrato de trigo com água de maceração de milho (10 e 20 g.L⁻¹), extrato de levedura (2 ou 5 g.L⁻¹) e/ou sulfato de amônio (0 e 5 g.L⁻¹). A concentração de glicose também foi variada em 20 e 40 g.L⁻¹. Em termos de produtividade máxima em biomassa e de fator de conversão de substrato em biomassa, os melhores valores foram obtidos quando utilizou-se 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 40 g.L⁻¹ de glicose. Em termos de concentração máxima de biomassa e de produtividade global em polissacarídeos, o melhor resultado foi obtido quando utilizou-se 20 g.L⁻¹ de água de maceração de milho e 40 g.L⁻¹ de glicose. Esta condição foi

utilizada para avaliar a influência de dois níveis de k_{La} inicial (10,2 e 19,3 h^{-1}) na produção de biomassa e polissacarídeos, em experimentos em escala ampliada (4 L), conduzidos em biorreator. O melhor resultado foi encontrado quando o k_{La} inicial de 10,2 h^{-1} foi utilizado. A atividade antimicrobiana de dois diferentes extratos (infusão do micélio fresco em água fervente – EI e solução de polissacarídeos obtidos da biomassa micelial – EP) e do caldo de cultivo de *P. ostreatus* cultivado no meio selecionado – CC foi avaliada contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. O caldo de cultivo e a infusão aquosa do micélio de *P. ostreatus* mostraram-se os mais indicados para inibir o crescimento de *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente.

Abstract

Among the basidiomycetes, fungi of the *Pleurotus* genus are recognized for presenting β -glucans with important medicinal properties as a constituent of the cellular wall of the fruit body or of the mycelium. The aims of this work were to select a culture medium that maximized the production of biomass and polysaccharides produced by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 and to evaluate the antimicrobial effects of the biomass extracts and the culture broth of *P. ostreatus* cultivated in the selected medium. The scale up of the process using the selected medium in two different values of initial K_La was also done. The experiments for the selection of the culture medium were carried out in Erlenmeyer flasks of 250 mL, containing 100 mL of the medium to be evaluated, maintained at 30°C, under reciprocal agitation (120 min⁻¹). Initially, three culture media were evaluated: POL (20 g.L⁻¹ of glucose, peptone, yeast extract, ammonium sulfate, magnesium sulfate and potassium phosphate), TD (wheat extract and 20 g.L⁻¹ of glucose) and POL-MIL (POL medium modified for the substitution of the yeast extract and peptone for corn steep liquor). The maximum productivity in cell ($P_{X_{m\acute{a}x}}$) was 0.63, 1.48 and 1.16 g.L⁻¹.day⁻¹, respectively for POL, TD and POL-MIL. By presenting the best results in terms of productivity in cells, TD was selected to give continuity to the experiments for the choice of the concentration of the carbon source. When 5, 10, 15 and 20 g.L⁻¹ of glucose were added to the wheat extract, a maximum productivity in biomass ($P_{X_{m\acute{a}x}}$) of 0.39, 0.64, 0.59 and 1.48 g.L⁻¹.day⁻¹, respectively, was verified. The yields in cell ($Y_{x/s}$) were 0.40, 0.63 and 0.88 g.g⁻¹ for POL, TD and POL-MIL, respectively. For glucose concentrations of 5, 10, 15 and 20 g.L⁻¹ the yield in cell ($Y_{x/s}$) were 0.56, 0.54, 0.58 and 0.63 g.g⁻¹ respectively. The productivity results showed that wheat extract, added of 20 g.L⁻¹ of glucose is the most propitious medium for production *Pleurotus ostreatus*, among the evaluated conditions. The good performance achieved with a medium composed by wheat extract and glucose led to a subsequent experiment in which a 2⁴ factorial design was constructed to evaluate the supplementation of the wheat extract with corn steep liquor (10 and 20 g.L⁻¹), yeast extract (2 or 5 g.L⁻¹) and/or ammonium sulfate (0 and 5 g.L⁻¹). The glucose concentration was also varied in 20 and 40 g.L⁻¹. In terms of maximum productivity in biomass and global productivity in polysaccharides, the best values were obtained when 5 g.L⁻¹ of yeast extract and 40 g.L⁻¹ of glucose were used. In terms of maximum concentration of biomass, the best results were obtained when 20 g.L⁻¹ of corn steep liquor and 40 g.L⁻¹ of glucose were used. This condition was used to evaluate the influence of two initial levels of kLa (10,2 and 19,3 h⁻¹) in the production of biomass and polysaccharides in experiments carried out in a bioreactor of 4 L. The best results were found when initial kLa of 10,2 h⁻¹ was used. The antimicrobial effects of two different extracts (infusion of fresh mycelium in boiling water - EI and a solution of the polysaccharides extracted of the micelial biomass - EP) and the culture broth of *P. ostreatus* cultivated in the screened medium - CC were evaluated against the

microorganisms *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The culture broth and the aqueous infusion of the mycelium of *P. ostreatus* were able to inhibit the growth of *E. coli* and *C. albicans*, respectively.

A parte experimental deste trabalho foi inteiramente realizada nos laboratórios da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

Fica decretado que, a partir deste instante,
haverá girassóis em todas as janelas,
que os girassóis terão direito
a abrir-se dentro da sombra;
e que as janelas devem permanecer, o dia inteiro,
abertas para o verde onde cresce a esperança.

Thiago de Melo

Dedico este trabalho aos meus filhos, Ana Clara e Gabriel e ao meu marido Celso, razões do meu viver.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Jorge Luiz Ninow pela orientação prestada durante a realização deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

À Co-orientadora e amiga Dra. Sandra Aparecida Furlan, pelo apoio, incentivo e pela minuciosa correção deste trabalho, meu mais profundo agradecimento.

Agradeço à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, que através da Área de Pesquisa, concedeu suporte técnico e financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, agradeço pela contribuição na obtenção dos conceitos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço imensamente à minha amiga Andréa Lima dos Santos Schneider, que de longa data caminha esta trilha ao meu lado e, cuja amizade, companheirismo e incentivo foram sem dúvida, os principais responsáveis pelo desfecho de mais esta etapa.

À amiga Elisabeth Wisbeck, agradeço imensamente pelos conselhos, sugestões e contribuições fornecidas para enriquecer este trabalho.

Às bolsistas do Programa de Iniciação Científica da Univille, Gisele Cristine Tesser e Jamile Rosa Rampinelli, meu agradecimento pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Giannini Apati, Ozair Souza, Beatriz Torrens e Márcia Lange da Silveira, obrigada por compartilhar comigo as alegrias e tristezas deste percurso.

Ao meu marido Celso e aos meus filhos Ana Clara e Gabriel, tomara que o imenso amor que eu sinto por vocês possa compensar toda a minha ausência.

Aos meus pais, Gercino Miranda e Mafalda Miranda, que determinaram a minha chegada até aqui, meu imenso carinho, amor e gratidão.

Finalmente, agradeço a este Ser maior que comanda nossas vidas e que permitiu que este trabalho fosse concluído.

Sumário

Aprovação	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Agradecimentos	ix
Sumário	xi
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xx
Lista de Símbolos	xxv
Introdução	1
Objetivos	3
Revisão Bibliográfica	5
1.1 Generalidades sobre os fungos	5
1.1.1 Divisão Basidiomicota	6

1.1.2 O gênero <i>Pleurotus</i>	7
1.1.2.1 Cultivo comercial de <i>Pleurotus</i>	10
1.2 Produção de micélio e substâncias bioativas em cultivo submerso	11
1.2.1 Fatores que influenciam no cultivo submerso de <i>Pleurotus</i> sp.	13
1.2.1.1 Oxigênio	14
1.2.1.2 Composição do meio de cultivo	15
1.3 Potencial terapêutico	19
1.3.1 β -D-glicanos	19
1.3.1.1 Síntese de β -glicanos	23
1.3.2 Ação antitumoral	25
1.3.3 Ação antimicrobiana e antiviral	25
Material e Métodos	30
2.1 Microrganismos e manutenção	30
2.2 Avaliação do uso de meios de cultivo alternativos para produção de biomassa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
2.2.1 Meios de cultivo	31
2.2.2 Condução dos ensaios	31
2.3 Suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose	32
2.3.1 Meio de cultivo	32
2.3.2 Condução dos ensaios	32
2.4 Definição da melhor composição do meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos	32
2.4.1 Meios de cultivo	32
2.4.2 Condução dos ensaios	34
2.5 Avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de $K_L a$ inicial	34

2.5.1 Meio de cultivo	34
2.5.2 Condução dos ensaios	34
2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do micélio e do caldo de cultivo de <i>P. ostreatus</i>	37
2.6.1 Preparo dos extratos	37
2.6.1.1 Extrato EI	37
2.6.1.2 Extrato EP	37
2.6.1.3 Caldo de cultivo bruto CC	37
2.6.2 Ativação dos microrganismos teste e preparo do inóculo	38
2.6.3 Condução dos ensaios	38
2.7 Métodos analíticos	39
2.7.1 Concentração celular	39
2.7.2 Concentração de glicose	39
2.7.3 Concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos	40
2.7.3.1 Extração do exopolissacarídeo do caldo de cultivo	40
2.7.3.2 Extração do polissacarídeo da biomassa micelial	41
2.7.3.3 Medida da concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos pelo método fenol-sulfúrico	41
2.7.4 Concentração de oxigênio dissolvido	42
2.7.4.1 Princípio de funcionamento do eletrodo	42
2.7.4.2 Procedimento de calibração do eletrodo	42
2.7.4.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)	43
2.8 Metodologias utilizadas nos cálculos	44
2.8.1 Fatores de conversão	45
2.8.1.1 Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	45
2.8.1.2 Fator de conversão de substrato em exopolissacarídeo ($Y_{E/S}$)	45
2.8.1.3 Fator de conversão de substrato em polissacarídeo ($Y_{PS/S}$)	45

2.8.1.4 Relação entre exopolissacarídeos e a biomassa e ($Y_{E/X}$)	46
2.8.1.5 Relação entre polissacarídeos e a biomassa (PSX)	46
2.8.2 Produtividades	47
2.8.2.1 Produtividade total em biomassa (P_X)	47
2.8.2.2 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$)	47
2.8.2.3 Produtividade global exopolissacarídeo (P_E)	47
2.8.2.4 Produtividade global em polissacarídeo (P_{PS})	48
2.8.3 Velocidades específicas de crescimento celular	48
2.9 Análises estatísticas	49
Resultados e Discussão	50
3.1 Avaliação do uso de meios de cultivo alternativos para produção de biomassa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	50
3.2 Suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose	55
3.3 Definição da melhor composição do meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos	59
3.4 Avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de K_L inicial	76
3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do micélio e do caldo de cultivo de <i>P. ostreatus</i>	82
Conclusões	86
Perspectivas	89

Referências	90
Anexos	108
Anexo A Curvas de calibração	108
Anexo B Dados experimentais dos experimentos para avaliação do uso de meios de cultivo alternativos na produção de biomassa de <i>P. ostreatus</i>	109
Anexo C Dados experimentais dos experimentos de suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose	111
Anexo D Dados experimentais do experimento para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos	114
Anexo E Dados experimentais do experimento para avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de $K_L a$ inicial	122
Anexo F Exemplo das curvas ajustadas para concentração de biomassa (X) e substrato (S) e dos cálculos realizados para obtenção da velocidade de produção de biomassa (dX/dt), da velocidade específica de produção de biomassa $-\mu_X$ (dX/Xdt), velocidade máxima específica de produção de biomassa - $\mu_{Xmáx}$ e da produtividade máxima em biomassa ($P_{xmáx}$)	123
Anexo G Exemplo da análise estatística realizada nos experimentos para determinação do meio de cultivo e nos experimentos para determinação da fonte de carbono e sua concentração	125
Anexo H Leituras de absorvância dos microrganismos teste em diferentes meios de cultivo	127
Anexo I Composição da água de maceração de milho e do extrato de levedura, da indústria Refinações de Milho Brasil Ltda., de acordo com HOCH (1997)	128

Lista de Figuras

Figura 1.1 Principais estruturas dos Basidiomicetos	6
Figura 1.2 Ciclo de vida básico dos Basidiomicetos – <i>Agaricus campestris</i>	7
Figura 1.3 <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
Figura 1.4 <i>Pleurotus ostreatus</i> em cultivo sólido	10
Figura 1.5 <i>Pelets</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtidos em cultivo submerso	13
Figura 1.6 Estrutura de um (1,3), (1,6)- β -D-glicano	21
Figura 2.1 Esquema do biorreator utilizado nos experimentos	36
Figura 3.1 Variação das concentrações de glicose (S) e de biomassa (X) de <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio POL, para as triplicatas avaliadas	51
Figura 3.2 Variação das concentrações de glicose (S) e de biomassa (X) de <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio TD, para as triplicatas avaliadas	52
Figura 3.3 Variação das concentrações de glicose (S) e de biomassa (X) de <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio POL-MIL, para as triplicatas avaliadas	53
Figura 3.4 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) e fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtida com os meios POL, TD e POL-MIL	54
Figura 3.5 Cinética de crescimento celular (X) e consumo de substrato (S) de <i>Pleurotus ostreatus</i> em extrato de trigo contendo 5 g/L de glicose, para as triplicatas avaliadas	55
Figura 3.6 Cinética de crescimento celular (X) e consumo de substrato (S) de <i>Pleurotus ostreatus</i> em extrato de trigo contendo 10 g/L de glicose, para as triplicatas avaliadas	56
Figura 3.7 Cinética de crescimento celular e consumo de substrato de <i>Pleurotus ostreatus</i> em extrato de trigo contendo 15 g/L de glicose, para as	

duplicatas avaliadas	56
Figura 3.8 Cinética de crescimento celular e consumo de substrato de <i>Pleurotus ostreatus</i> em extrato de trigo contendo 20 g/L de glicose, para as triplicatas avaliadas	57
Figura 3.9 Produtividade máxima em biomassa ($P_{x\text{máx}}$) e fator de conversão de substrato em biomassa de <i>Pleurotus ostreatus</i> ($Y_{X/S}$) obtidas com diferentes concentrações iniciais de glicose em extrato de trigo	57
Figura 3.10 Cinética de produção de biomassa de <i>P. ostreatus</i> (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 1 a 6	60
Figura 3.11 Cinética de produção de biomassa de <i>P. ostreatus</i> (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 7 a 11	61
Figura 3.12 Cinética de produção de biomassa de <i>P. ostreatus</i> (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 12 a 17	62
Figura 3.13 Produtividade máxima em biomassa ($P_{X\text{máx}}$) e produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}) para os experimentos 1 a 17	64
Figura 3.14 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável $P_{X\text{máx}}$ em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e concentração inicial de glicose	66
Figura 3.15 Efeito da concentração inicial de glicose e da concentração da fonte de nitrogênio inorgânico sobre a produtividade máxima em biomassa ($P_{X\text{máx}}$), quando a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico estão no nível superior	67
Figura 3.16 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável P_{PS} em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e fonte de nitrogênio orgânico	67
Figura 3.17 Efeito da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e da fonte de nitrogênio orgânico sobre a produtividade total em polissacarídeos (P_{PS}), quando as concentrações de nitrogênio inorgânico e de glicose encontram-se no nível inferior	68

- Figura 3.18 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável PSX em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e fonte de nitrogênio orgânico 69
- Figura 3.19 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável PSX em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração inicial de glicose e fonte de nitrogênio orgânico 69
- Figura 3.20 Efeito da fonte de nitrogênio orgânico e da concentração de nitrogênio inorgânico sobre a relação entre a concentração de biomassa e a concentração de polissacarídeos (PSX), quando a concentração inicial de glicose e a concentração de nitrogênio orgânico estão no nível inferior e superior, respectivamente 70
- Figura 3.21 Efeito da concentração de nitrogênio orgânico e da concentração inicial de glicose sobre a relação entre a concentração de biomassa e a concentração de polissacarídeos (PSX), quando a fonte de nitrogênio orgânico e a concentração de nitrogênio inorgânico estão no nível superior 70
- Figura 3.22 Cinética de produção de biomassa (X), de consumo de substrato (S), de consumo de oxigênio (pO₂) e de produção de exopolissacarídeos (E) para *P. ostreatus* cultivado em K_La inicial de 19,3 h⁻¹ 76
- Figura 3.23 Cinética de produção de biomassa (X), de consumo de substrato (S), de consumo de oxigênio (pO₂) e de produção de exopolissacarídeos (E) para *P. ostreatus* cultivado em K_La inicial de 10,2 h⁻¹ 77
- Figura 3.24 Biomassa de *P. ostreatus* formada após 6 dias de cultivo submerso em biorreator, em meio contendo água de maceração de milho, extrato de trigo e glicose 78
- Figura 3.25 Percentual de inibição do crescimento dos microrganismos teste

obtido com a infusão a quente (EI) e com a solução de polissacarídeos (EP) do micélio de <i>P. ostreatus</i> e com o caldo de cultivo bruto do fungo (CC)	82
Figura 3.26 Crescimento celular (absorvância a 460 nm) de <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>C. albicans</i> em meio contendo 50% de EI, CC e EP	83
Figura A.1 Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de glicose pelo método enzimático GOD/POD	108
Figura A.2 Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos (açúcares solúveis totais) pelo método fenol-sulfúrico	108
Figura F.1 Concentração de biomassa (X), logaritmo neperiano da concentração de biomassa ($\ln X$), velocidade de produção de biomassa (dX/dt) e velocidade específica de produção de biomassa (μX) em função do tempo de cultivo (t) para o experimento POL A	124

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Efeitos medicinais de <i>Pleurotus</i> spp	22
Tabela 1.2 Ativadores, cofatores e proteínas auxiliares na síntese de β - glicanos	24
Tabela 2.1 Fatores avaliados no planejamento fatorial dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos. Os índices (-), (0) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior, central e superior, respectivamente	33
Tabela 2.2 Planejamento fatorial dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos	33
Tabela 3.1 Máxima concentração de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), concentração de substrato no ponto onde X é máximo ($S_{Xm\acute{a}x}$), produtividade máxima em biomassa ($P_{Xm\acute{a}x}$), produtividade total em biomassa (P_X), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{Xm\acute{a}x}$) obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e da fonte de carbono	58
Tabela 3.2 Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade máxima em biomassa ($P_{Xm\acute{a}x}$), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), velocidade específica máxima de produção de biomassa ($\mu_{Xm\acute{a}x}$), concentração de polissacarídeos (PS), relação entre a biomassa e polissacarídeos (PSX), produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}) e fator de conversão de substrato em polissacarídeos ($Y_{PS/S}$), para os experimentos 1 a 17	63
Tabela 3.3 Efeitos dos fatores avaliados sobre a concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), sobre a produtividade máxima em biomassa ($P_{Xm\acute{a}x}$), sobre o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{Xm\acute{a}x}$), sobre a produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}), sobre a concentração de polissacarídeos (PS) e sobre o fator de conversão de substrato em	

polissacarídeos ($Y_{PS/S}$)	65
Tabela 3.4 pH inicial e final dos diferentes meios de cultivo	72
Tabela 3.5 Parâmetros cinéticos para <i>P. ostreatus</i> cultivado em K_L inicial de 19,3 e $10,2 \text{ h}^{-1}$	77
Tabela 3.6 Concentração celular obtida por diversos autores no cultivo de fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	81
Tabela B.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio POL, para o intervalo de 0 a 12 dias	109
Tabela B.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio POL-MIL, para o intervalo de 0 a 12 dias	109
Tabela B.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio TD, para o intervalo de 0 a 12 dias	110
Tabela B.4 $X_{m\acute{a}x}$, X_0 , S_f , $S_{Xm\acute{a}x}$, S_i , $P_{Xm\acute{a}x}$, P_X , $Y_{X/S}$ e $\mu_{Xm\acute{a}x}$ para os experimentos para avaliação do uso de meios de cultivo alternativos na produção de biomassa de <i>P. ostreatus</i>	110
Tabela C.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o extrato de trigo contendo 5 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias	111
Tabela C.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o extrato de trigo contendo 10 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias	111
Tabela C.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o extrato de trigo contendo 15 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias	112
Tabela C.4 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o extrato de trigo contendo 20 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias	112

Tabela C.5 $X_{m\acute{a}x}$, X_0 , S_f , $S_{Xm\acute{a}x}$, S_i , $P_{Xm\acute{a}x}$, P_X , $Y_{X/S}$ e $\mu_{Xm\acute{a}x}$ para os experimentos de suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose	113
Tabela D.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 1, para o intervalo de 0 a 13 dias	114
Tabela D.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 2, para o intervalo de 0 a 13 dias	114
Tabela D.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 3, para o intervalo de 0 a 13 dias	115
Tabela D.4 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 4, para o intervalo de 0 a 13 dias	115
Tabela D.5 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 5, para o intervalo de 0 a 13 dias	115
Tabela D.6 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 6, para o intervalo de 0 a 13 dias	116
Tabela D.7 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 7, para o intervalo de 0 a 14 dias	116
Tabela D.8 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 8, para o intervalo de 0 a 14 dias	116
Tabela D.9 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 9, para o intervalo de 0 a 10 dias	117
Tabela D.10 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 10, para o intervalo de 0 a 10 dias	117
Tabela D.11 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 11, para o intervalo de 0 a 14 dias	117

Tabela D.12	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 12, para o intervalo de 0 a 14 dias	118
Tabela D.13	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 13, para o intervalo de 0 a 8, para o intervalo de 0 a 8 dias dias	118
Tabela D.14	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 14, para o intervalo de 0 a 9 dias	118
Tabela D.15	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 15, para o intervalo de 0 a 13 dias	119
Tabela D.16	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 16, para o intervalo de 0 a 13 dias	119
Tabela D.17	Varição da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 17, para o intervalo de 0 a 12 dias	119
Tabela D.18	Parâmetros cinéticos obtidos das curvas ajustadas aos dados experimentais dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos	120
Tabela E.1	Varição da concentração de biomassa (X), glicose (S), exopolissacarídeos (E) e pressão parcial de oxigênio dissolvido ($pO_2\%$) em função do tempo de cultivo para o experimento com K_{La} inicial de $10,2\text{ h}^{-1}$, no intervalo de 0 a 6 dias	122
Tabela E.2	Varição da concentração de biomassa (X), glicose (S), exopolissacarídeos (E) e pressão parcial de oxigênio dissolvido ($pO_2\%$) em função do tempo de cultivo para o experimento com K_{La} inicial de $19,3\text{ h}^{-1}$, no intervalo de 0 a 10 dias	122
Tabela F.1	Biomassa (X), derivada de X em função do tempo de cultivo (dX/dt), velocidade específica de crescimento = $\mu = (dX/Xdt)$, velocidade	

velocidade específica de crescimento - μ_X (dX/Xdt), velocidade específica de crescimento máxima - $\mu_{X_{m\acute{a}x}}$ (ln X) e produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{m\acute{a}x}}$) para o experimento com o meio POL A	123
Tabela G.1 Replicatas das produtividades máximas ($P_{X_{m\acute{a}x}}$) em biomassa obtidas nos experimentos utilizando os meios de cultivo POL, TD e POL-MIL	125
Tabela G.2 Teste estatístico ANOVA para os dados apresentados na Tabela G.1	125
Tabela H.1 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de <i>E. coli</i> cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e EP e meio contendo o caldo de cultivo CC	127
Tabela H.2 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de <i>B. subtilis</i> cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e EP e meio contendo o caldo de cultivo CC	127
Tabela H.3 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de <i>C. albicans</i> cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e EP e meio contendo o caldo de cultivo CC	127

Lista de Símbolos

4-AF – 4-aminofenazona;

ABS – absorvância;

C – concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol.L^{-1});

C* – concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol.L^{-1});

CC – caldo de cultivo de *P. ostreatus* DSM 1833;

CCT -

C:N – relação carbono:nitrogênio;

DSM - Deutsche Sammlung van Mikroorganismen und Zellkulturen;

E₀ – concentração inicial de exopolissacarídeo (g.L^{-1});

E_{máx} – concentração máxima de exopolissacarídeo, medida no tempo onde $dE/dt=0$ (g.L^{-1});

E – concentração de exopolissacarídeo no instante t (g.L^{-1});

EI – extrato obtido da infusão do micélio em água;

EP – polissacarídeos extraídos do micélio;

ET – extrato de trigo;

FO – fonte orgânica de nitrogênio;

GLI – concentração inicial de glicose;

GMP – guanosina monofosfato;

GOD – glicose oxidase;

GTP – guanosina trifosfato;

k_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

MIL – água de maceração de milho;

MnP – manganês peroxidase;

NA – ágar nutriente;

NDP – nucleotídeo difosfato;

- NI – concentração da fonte inorgânica de nitrogênio;
- NO - concentração da fonte orgânica de nitrogênio;
- P_0 – concentração inicial de polissacarídeos do micélio (g.L^{-1});
- P_f - concentração final de polissacarídeos do micélio, medida no tempo onde o processo foi interrompido (g.L^{-1});
- P_P – produtividade total em polissacarídeos do micélio [$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$];
- P_X – produtividade total em biomassa [$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$];
- $P_{X_{\text{máx}}}$ – produtividade máxima em biomassa [$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$];
- P_E – produtividade total em exopolissacarídeo [$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$];
- $P_{E_{\text{máx}}}$ – produtividade máxima em exopolissacarídeo [$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$];
- pO_2 – concentração de oxigênio dissolvido (%);
- POD – peroxidase;
- POL – meio de cultivo indicado para a produção de exopolissacarídeos;
- POL-MIL – meio POL modificado;
- RNA – ácido ribonucléico;
- rpm – rotações por minuto;
- S_0 – concentração inicial de substrato (g.L^{-1});
- $S_{X_{\text{máx}}}$ – concentração de substrato medida no tempo onde $dX/dt=0$ e a concentração de biomassa é máxima (g.L^{-1});
- $S_{E_{\text{máx}}}$ - concentração de substrato medida no tempo onde $dE/dt=0$ e a concentração de exopolissacarídeo é máxima (g.L^{-1});
- S_f – concentração final de substrato, medida no tempo onde o processo foi interrompido (g.L^{-1});
- STR – stirred tank reactor;
- t – tempo no instante t (dias);
- $t_{X_{\text{máx}}}$ – tempo de cultivo onde a concentração de biomassa é máxima e $dX/dt=0$ (dias);
- $t_{E_{\text{máx}}}$ – tempo de cultivo onde a concentração de exopolissacarídeo é máxima e $dE/dt=0$ (dias);
- t_f – tempo no qual o processo fermentativo foi interrompido (dias);
- TD – meio de cultivo composto de trigo e dextrose;

TDA – meio de cultivo composto de trigo, dextrose e ágar;

VAES – valor estatisticamente significativo;

VP – veratril álcool peroxidase;

v/v – volume/volume;

vvm – volume de ar por volume de meio;

X_0 – concentração inicial de biomassa (g.L^{-1});

$X_{E_{\text{máx}}}$ – concentração de biomassa onde a concentração de exopolissacarídeo é máxima e $dE/dt=0$ (g.L^{-1});

X – concentração de biomassa no instante t (g.L^{-1});

X_f – concentração final de biomassa, medida no tempo onde o processo foi interrompido (g.L^{-1});

$X_{\text{máx}}$ – concentração máxima de biomassa, medida no tempo onde $dX/dt=0$ (g.L^{-1});

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de glicose em polissacarídeo (g.g^{-1});

$Y_{P/X}$ – fator de conversão de biomassa em polissacarídeo (g.g^{-1});

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de glicose em biomassa (g.g^{-1});

$Y_{E/X}$ – fator de conversão de biomassa em exopolissacarídeo (g.g^{-1});

$Y_{E/S}$ – fator de conversão de glicose em exopolissacarídeo (g.g^{-1});

YE – extrato de levedura;

YMA – extrato de levedura, malte e ágar;

$\mu_{X_{\text{máx}}}$ – máxima velocidade específica de crescimento (dia^{-1}).

INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido reportados como uma fonte inesgotável de compostos bioativos como antibióticos, polissacarídeos com ação antitumoral, enzimas, micotoxinas, vitaminas, entre outros.

Dentre os fungos pertencentes à classe dos basidiomicetos, os do gênero *Pleurotus* são reconhecidos por apresentar β -glicanos com propriedades medicinais como constituintes da parede celular tanto do basidioma como do micélio (BOBEK *et al.*, 1991a; BOBEK *et al.*, 1991b; ZHANG *et al.*, 1994; NOSÁL'OVÁ, *et al.*, 2001; HOSSAIN *et al.*, 2003; PRAMANIK, 2005), bem como excretar polissacarídeos para o meio quando cultivados em meio líquido (GUTIÉRREZ, *et al.*, 1996; ROSADO *et al.*, 2003).

Além disso, *Pleurotus* destaca-se por crescer facilmente em uma ampla gama de substratos, tais como palhas de cereais, grãos, polpa de café, bagaço de cana-de-açúcar, palha de folhas de bananeira etc. (PATRABANSH & MADAN, 1997; OBODAI *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2003 ; BONATI *et al.*, 2004; SALMONES *et al.*, 2005).

As propriedades medicinais aliadas à facilidade de cultivo fizeram com que, de 1987 a 1997, a produção mundial de *Pleurotus* crescesse cerca de 400%, colocando este gênero em terceiro lugar no ranking da produção mundial, que traz os gêneros *Agaricus* e *Lentinus* em primeiro e segundo lugares, respectivamente (CHANG, 1999).

Paralelamente aos estudos visando o melhoramento do cultivo sólido de *Pleurotus*, alguns autores vêm pesquisando o cultivo submerso deste gênero, com os mais variados objetivos tais como a produção de: inóculo líquido (ROSADO *et al.*, 2002; SILVEIRA, 2003), exopolissacarídeos (BURNS *et al.*, 1994; WISBECK, 2003), celulasas extracelulares (GARZILLO & PAOLO, 1994), agentes flavorizantes (MARTIN, 1992), β -glicosidases (MORAIS *et al.*, 2002), antimicrobianos (HARA *et al.*, 1987; BELTRAN –GARCIA *et al.*, 1997; WISBECK *et al.*, 2002), vitaminas do grupo B (SOLOMKO & ELISEEVA, 1988) etc. Estes estudos envolvem invariavelmente a busca por meios de cultivo que proporcionem elevados rendimentos em produto, com baixo custo. Para tanto, meios de cultivo alternativos, compostos por resíduos industriais têm

sido testados (LENA & SERMANNI, 1994; CRUZ, 1997; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2003).

O extrato de trigo proveniente da cocção em água fervente dos grãos de trigo utilizados como inóculo ou *spawn* é um resíduo da agroindústria de cogumelos. Este extrato, descartado como um resíduo do processo, foi avaliado para o crescimento micelial de *Pleurotus* (FURLAN *et al.*, 1997; WISBECK, 2003), apresentando bons resultados para a produção de biomassa deste fungo. Este fato despertou o interesse para a realização de um trabalho cuja proposta fosse otimizar a produção de biomassa e polissacarídeos intra e extracelulares, agregando valor ao resíduo gerado durante a produção de *spawn*.

Considerando que a produção mundial de *Pleurotus* e *Agaricus* em 1997 totalizava 2.831.500 toneladas métricas (cogumelos frescos) (CHANG, 1999), estima-se que foram utilizadas 42.472 ton de trigo como *spawn*, gerando aproximadamente 40.000 L de água residual que poderiam ser convertidos em polissacarídeos intra e extracelulares de alto valor comercial. 100 mg do 1,3 β -glicano purificado de leveduras é vendido hoje pela Sigma a R\$2.649,00 (www.sigma-aldrich.com.br).

Uma vez que o crescimento do fungo depende da presença de elementos nutritivos presentes no meio de cultivo, um melhor entendimento dos requerimentos nutricionais e das condições de cultivo utilizadas, trará uma significativa contribuição ao desenvolvimento de processos que proporcionem um maior rendimento em biomassa e em produtos.

Desta forma, este trabalho propôs definir a concentração e tipo da fonte de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio e água de maceração do milho) e concentração glicose, que maximizem tanto a produção de biomassa como a de polissacarídeos intra e extracelulares, de forma a tornar este processo viável economicamente para os produtores de *spawn* e de corpos frutíferos deste fungo. O trabalho ainda propôs avaliar o meio de cultivo selecionado em escala ampliada usando dois valores de $K_L a$ inicial e o potencial antimicrobiano do caldo de cultivo e de extratos e polissacarídeos obtidos da biomassa micelial deste fungo, produzida na melhor condição encontrada nos experimentos conduzidos neste trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Definir um meio de cultivo que maximize a produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, avaliar o desempenho de *Pleurotus ostreatus* neste meio em escala ampliada, em diferentes valores de K_La inicial e avaliar a produção de antimicrobianos

Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho de *Pleurotus ostreatus* em termos de produção de biomassa em dois meios de cultivo alternativos (POL-MIL e TD) e comparar os resultados com aqueles obtidos em meio POL, tradicionalmente utilizado na produção de polissacarídeos por este fungo;
- Definir a concentração e o tipo da fonte de nitrogênio orgânico (2 ou 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura ou 10 ou 20 g.L⁻¹ de água de maceração do milho) que proporcione melhores resultados em termos de produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus*;
- Definir a concentração de nitrogênio inorgânico (0 ou 5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio) que proporcione melhores resultados em termos de produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus*;
- Definir a concentração de glicose (20 ou 40 g.L⁻¹) que proporcione melhores resultados em termos de produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus*;
- Avaliar a melhor formulação do meio de cultivo em escala ampliada, em dois valores iniciais de K_La (10,2 e 19,3 h⁻¹) em termos de produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus*;

- Avaliar o potencial antimicrobiano do caldo de cultivo e de extratos do micélio e de polissacarídeos obtidos da biomassa micelial de *P. ostreatus*, produzida na melhor condição encontrada nos experimentos conduzidos neste trabalho.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Generalidades sobre os fungos

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, no caso das leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores, incluindo os cogumelos (fungos macroscópicos). A parede celular fúngica é composta, de modo geral, por glicanos, mananas e, em menor quantidade, por quitina, proteínas e lipídeos, podendo possuir até oito camadas sendo que cada camada possui um polissacarídeo dominante: as camadas mais internas (8ª e 5ª) contêm beta-1-3 glicanos e mananas, enquanto as mais externas contêm mananas e beta-1-6 glicanos. Os glicanos nas células fúngicas são normalmente polímeros de D-glicose ligados através de pontes beta-glicosídicas. As mananas representam o material amorfo da parede e a quitina é encontrada como microfibrilas cristalinas, dentro de uma matriz protéica. Os lipídeos representam somente 1 a 2% do peso seco celular (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os fungos podem se desenvolver em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, sendo constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo - as hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de absorção de nutrientes e de sustentação, é chamado micélio vegetativo. O micélio que se projeta acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo (TRABULSI *et al.*, 1999).

1.1.1 Divisão Basidiomicota

O esquema taxonômico tradicional classifica os fungos em quatro divisões baseadas primariamente nas variações na reprodução sexuada: Zigomicota, Ascomicota, Basideomicota e Deuteromicota. Baseado em estudos com o rRNA 18S, microbiologistas moleculares incluíram a divisão Deuteromicota (Fungos Imperfeitos) nas divisões Zigomicota, Ascomicota ou Basidiomicota em função de suas semelhanças e adicionaram a classe dos Chistriomicetos (PRESCOTT *et al.*, 2002).

A classe Basidiomicetos inclui os cogumelos comestíveis como os dos gêneros *Agaricus* e *Pleurotus*, os venenosos, os dentiformes e as orelhas-de-pau (RAVEM, 2001). A Figura 1.1 mostra as principais estruturas dos basidiomicetos: compreende fungos de hifas septadas, que se caracterizam pela produção de esporos sexuais, os basidiosporos, típicos de cada espécie. Conídios ou propágulos assexuados também podem ser encontrados (TRABULSI *et al.*, 1996).

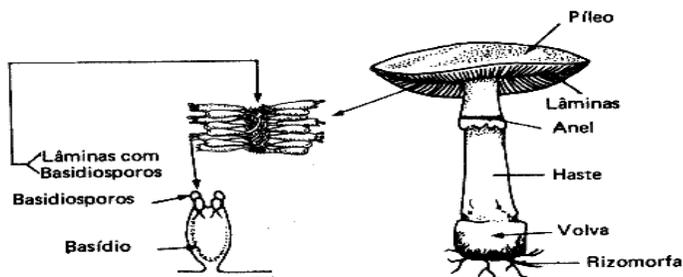


Figura 1.1 Principais estruturas dos Basidiomicetos.

Fonte: TRABULSI *et al.*, (1996).

A Figura 1.2 apresenta o ciclo de vida básico dos basidiomicetos: os esporos, ao entrarem em contato com um substrato adequado germinam e produzem um micélio primário que irá, por sua vez, produzir outros esporos; em seguida, estes formam um micélio secundário, dicariótico, pela fusão de linhagens diferentes, resultando micélios heterocarióticos; o micélio terciário, dicariótico, forma o basidioma, que contém os basídios alinhados no himênio sobre as lâminas. Finalmente bilhões de basidiósporos são liberados (RAVEM *et al.*, 2001).

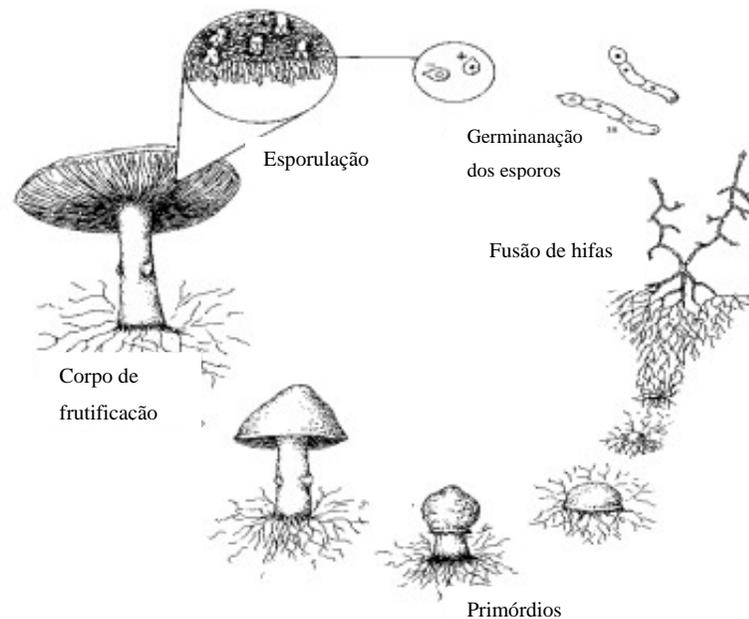


Figura 1.2 Ciclo de vida básico dos Basidiomicetos – *Agaricus campestris*.

Fonte: BENJAMIN (1999).

Culturas do micélio são geralmente derivadas dos esporos ou pedaços de tecido que germinam e crescem em meio sólido, constituído de extrato de levedura, extrato de malte e glicose, que é o composto central tanto para a produção de metabólitos primários, como secundários (LORENZEN & ANKE, 1998).

1.1.2 O gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* (Poliporaceae, Agaricales, Basidiomicetos superiores) (PUTZKE & PUTZKE, 1998) constitui um grupo cosmopolita de fungos com alto valor nutricional e propriedades terapêuticas, com várias aplicações ambientais e biotecnológicas (COHEN *et al.*, 2002).

Pleurotus spp. são cogumelos comestíveis aromáticos, encontrados nas zonas temperadas do hemisfério norte. Estas espécies são caracterizadas por esporos brancos, ligados às lamelas (COHEN *et al.*, 2002).

O nome comum “cogumelo ostra” provém da aparência em forma de concha do corpo frutífero. Este cogumelo representa uma valiosa fonte de proteínas e a sua produção tem aumentado significativamente nos últimos anos (CHANG, 1999), provavelmente devido à facilidade de cultivo.

O sistema ligninolítico de *Pleurotus* spp. tem sido extensivamente estudado nos últimos anos. Três famílias de enzimas ligninolíticas foram caracterizadas: manganês peroxidase (MnP), peroxidase (VP) e lacase (GARZILLO *et al.*, 1994). Estas enzimas podem ser usadas para várias aplicações ambientais e biotecnológicas. *Pleurotus* spp. e suas enzimas servem como alternativa eficiente para biorremediação de poluentes recalcitrantes e mostram habilidade em degradar e mineralizar substâncias químicas tóxicas, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), atrazina, organofosforados etc. (NOVOTNNÝ *et al.*, 2004, RODRIGUES *et al.*, 2004).

Devido a este sistema enzimático, *Pleurotus* spp. possuem a capacidade de se desenvolver em qualquer resíduo que contenha celulose, hemicelulose e lignina sem a necessidade de uma fermentação prévia do substrato. Sendo assim, o gênero *Pleurotus* cresce em uma ampla variedade de resíduos agro-florestais, tais como serragem, papel, palhas de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de café, folhas de bananeira, bagaço de milho, resíduo de agave, polpa de soja, resíduos de algodão, casca de amendoim, farinha de trigo, malte e cevada etc. Após o cultivo de *Pleurotus*, alguns destes substratos podem ser reciclados e utilizados para ração animal ou no preparo de outros produtos, uma vez que a degradação seletiva da lignina e da hemicelulose resulta na exposição da celulose tornando o resíduo utilizável por ruminantes (KAKKAR *et al.*, 1990; JALC *et al.*, 1999).

Estes fungos são também extremamente eficientes na conversão do substrato em biomassa, alcançando freqüentemente rendimentos acima de 100%, quando somados os vários fluxos produtivos (BANO e RAJARATHNAM, 1988; BONONI, 1995; YILDIZ *et al.*, 1996; RAJARATHNAM & BANO, 1991, citados por GUNDE-CIMERMAN, 1999; ZERVAKIS *et al.*, 2001).

De 1986 a 1991, a produção mundial de cogumelos cresceu 96%, variando em 31% para *Agaricus*, 64% para *Lentinus* e 443% para *Pleurotus* (CHANG, 1996). Em 1997, esta espécie representava 14% da produção mundial de cogumelos comestíveis (CHANG, 1999). Uma das razões para o sucesso deste gênero é o fato de ser o de mais fácil e barato cultivo dentre todos os cogumelos cultivados industrialmente, apresentando grande adaptabilidade, agressividade e produtividade (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Paralelamente à facilidade de cultivo, cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam um bom valor nutricional, possuindo um alto teor de fibras, quantidades moderadas de proteínas de boa qualidade com a maior parte dos aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (BANO & RAJARATHNAM, 1988; BONATTI, 2001; RAGUNATHAN & SWAMINATHAN, 2003).

Além disso, nos últimos anos, comprovações científicas do valor medicinal do gênero *Pleurotus* começaram a surgir, atribuindo a este fungo atividade modulatória do sistema imune (NOSÁL'OVÁ *et al.*, 2001), efeito de abaixamento da pressão arterial (TAM *et al.*, 1986), efeito inibidor do crescimento de tumores (MIZUNO, 1999) e ação antiinflamatória e antimicrobiana (LORENZEN & ANKE, 1998).

No gênero *Pleurotus* são encontradas várias espécies comestíveis, entre elas *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus tuber-regium*, entre outros. A cor do píleo ou chapéu difere para cada uma destas espécies, assim como a temperatura de frutificação, necessidades nutricionais e tempo de incubação (BONONI, 1995).

Uma das principais espécies deste gênero é *Pleurotus ostreatus* (Figura 1.3), conhecido no Brasil como cogumelo caetuba, cogumelo gigante ou fungi.

Comercialmente, *Pleurotus ostreatus* começou a ser cultivado nos Estados Unidos em 1900 e, nos anos subseqüentes, foi introduzido na Índia e na Europa (GUNDE-CIMERMAN, 1999).



Figura 1.3 *Pleurotus ostreatus*.

Fonte: disponível na internet <www.sporetradingpost.com/culturerroom.htm> Acesso em: 22 out. 2003.

1.1.2.1 Cultivo comercial de *Pleurotus*

Inicialmente o gênero *Pleurotus* era cultivado em troncos de árvore, mas com o aumento de seu consumo, uma técnica mais simples foi desenvolvida por BISARIA & MADAN (1983) para o seu cultivo, utilizando como substrato palhas acondicionadas em pacotes plásticos ou garrafas. A Figura 1.4 mostra o cultivo de *Pleurotus ostreatus* em substrato sólido, formando os corpos frutíferos ou basidioma.



Figura 1.4 *Pleurotus ostreatus* em cultivo sólido.

Fonte: Autor. Laboratório de Cultivo de Basidiomicetos - UNIVILLE

Segundo Bononi *et al* (1995), o cultivo comercial de *Pleurotus* exige as seguintes etapas: preparo da matriz (*spawn*), compostagem, pasteurização, semeadura, incubação, produção e colheita. O inóculo, *spawn*, ou semente consiste de um suporte sólido impregnado com micélio fúngico. De acordo com Raper (1978) e Abe *et al.* (1992), vários grãos podem ser usados como suporte: painço, sorgo, centeio, arroz e trigo, sendo que os dois últimos proporcionam melhores resultados (CASSOU *et al.*, 2001). Segundo Zadrazil & Kurtzman (1984), além do inóculo em grãos, pode-se citar ainda o micélio ativo (o próprio substrato inoculado) e o inóculo líquido, mas sem dúvida, o mais utilizado é o inóculo em grãos de trigo. Segundo metodologia usada por Bonati (2001) os grãos de trigo devem ser cozidos em água na proporção 1:2 (grãos de trigo:água – p:v). O extrato proveniente do cozimento é drenado e os grãos são adicionados de CaCO₃ e CaSO₄, embalados em sacos de polipropileno e esterilizados. Após esterilização, cada embalagem é inoculada com o micélio e incubada por aproximadamente 15 dias, até colonização completa pelo micélio fúngico. A água residual de cocção dos grãos de trigo resultante deste processo, acrescida de glicose e ágar (meio TDA – trigo dextrose ágar) foi testada por FURLAN *et al.* (1997) e apresentou-se como um extrato bastante apropriado para o cultivo do gênero *Pleurotus* em meio sólido.

Nas últimas décadas, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para otimizar parâmetros físicos, químicos e biológicos do processo de cultivo destes cogumelos usando resíduos agro-industriais (TRIPATHI & YADAV, 1992; ZERVAKIS & BALIS, 1992; PATRABANSH & MADAN, 1997; YILDIZ *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000; BONATTI, 2001; OBODAI *et al.*, 2003; BONATI, 2004; SALMONES *et al.*, 2005).

1.2 Produção de micélio e substâncias bioativas em cultivo submerso

A produção de micélio em cultivo submerso é relativamente recente quando comparada ao cultivo tradicional em substrato sólido. A experiência adquirida com a II Guerra Mundial na produção de antibióticos levou a experimentos usando reatores aerados e agitados com vários fungos, utilizando materiais de baixo custo como resíduos da indústria de alimentos, reduzindo a demanda bioquímica de oxigênio destes resíduos (MARTIN, 1992).

Além disso, o cultivo submerso de fungos tem a vantagem de produzir grandes quantidades de micélio, num curto período de tempo e em qualquer época do ano, obtendo-se produtos de qualidade uniforme, uma vez que as condições de cultivo (pH, concentração de nutrientes, aeração etc.) podem ser controladas (ROSADO *et al.*, 2002).

O cultivo submerso de fungos filamentosos tem sido empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de enorme importância econômica e social tais como os antibióticos, enzimas, micotoxinas, vitaminas, entre outros. Além disso, muitos trabalhos reportam a produção de polissacarídeos constituintes da massa micelial de fungos produzidos em cultura submersa, bem como a produção de exopolissacarídeos excretados para o meio de cultivo líquido com atividade terapêutica (CAVAZONI & ADAMI, 1992; BURNS *et al.*, 1994; MAZIERO *et al.*, 1999; LEIFA *et al.*, 2001; WISBECK *et al.*, 2002; ROSADO *et al.*, 2003).

Mais recentemente começaram a surgir pesquisas mostrando outros usos da biomassa micelial de alguns fungos, como os reportados por Rosado *et al.* (2002) e Silveira (2003) que estudaram o uso da biomassa de fungos do gênero *Pleurotus* cultivados em meio líquido como inóculo para a produção de cogumelos comestíveis em meio sólido.

Hadar e Cohen-Arazi (1986) cultivaram *Pleurotus ostreatus* var. *florida* em cultivo líquido e compararam os constituintes químicos dos basidiomas produzidos em palha de algodão com os constituintes dos *pellets* formados em cultivo líquido. Os resultados das análises de nitrogênio total, proteínas, glicogênio, ácidos graxos, RNA e cinzas mostraram-se bastante similares para ambos. Diferenças foram observadas no teor de seis aminoácidos e no maior teor de ácidos graxos saturados do micélio. A composição da parede celular típica de basidiomicetos foi observada em ambos, micélio e basidioma.

Tawiah *et al.* (1987), Martin (1992) e Scherba *et al.* (1999), também observaram que a composição química do micélio de *Pleurotus ostreatus* produzido em cultivo submerso e a obtida dos corpos frutíferos eram bastante similares em termos de carboidratos, proteínas e lipídeos. Babitskaya *et al.* (1996) estudaram a composição do micélio e dos corpos frutíferos de uma cepa selecionada de *Pleurotus ostreatus*. Análises comparativas mostraram que o micélio vegetativo continha mais proteínas do que os corpos frutíferos (43-45% e 30 –36%, respectivamente) e 1,2 a 1,3 vezes maior

quantidade de aminoácidos importantes para o organismo, incluindo lisina, valina e cistina.

A similaridade na constituição química dos corpos frutíferos e do micélio permite o uso deste como integrador e aromatizador de alimentos industrializados como sopas, cremes e como fonte de vitaminas e proteínas (SOLOMONS, 1975).

O tipo de biorreator utilizado no cultivo submerso é importante para o desenvolvimento do micélio do cogumelo e/ou seus metabólitos. A maioria dos autores tem utilizado o processo batelada agitado em frascos Erlenmeyer ou em biorreatores (STR) para o estudo deste tipo de fermentação, dando origem ao micélio na forma de *pellets* (Figura 1.5) (BURNS, 1993; MAZIERO *et al.*, 1999; ROSADO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003; ZHANG, *et al.*, 2003).



Figura 1.5 *Pellets* de *Pleurotus ostreatus* obtidos em cultivo submerso.

1.2.1 Fatores que influenciam no cultivo submerso de *Pleurotus* sp.

A influência de diversos parâmetros sobre a produção de biomassa e compostos bioativos, tais como a composição do meio de cultivo, a temperatura de incubação, o pH, a agitação, a transferência de oxigênio, entre outros, tem sido estudada em cultivo submerso de fungos do gênero *Pleurotus*.

Segundo diversos autores, *Pleurotus* sp. pode crescer em uma faixa de pH que varia de 5,0 a 8,0 (GO *et al.*, 1984; SOLOMKO e ELISEEVA, 1988; EYAL, 1991; BURLA *et al.*, 1992; BUSWELL & CHANG, 1994; FURLAN *et al.*, 1997; BUGARSKI *et al.*, 2002) e a temperatura ótima de cultivo está entre 30 e 35°C (OSO, 1977; BURLA *et al.*, 1992; ZERVAKIS *et al.*, 2001).

1.2.1.1 Oxigênio

Em uma breve revisão sobre os efeitos da pressão parcial de oxigênio, Olsvik *et al.* (1993) observaram que a resposta das células a este fator é um fenômeno complexo. Muitas vias fermentativas são induzidas ou reprimidas pelo oxigênio dissolvido, que também parece afetar a composição da parede celular e, conseqüentemente, a flexibilidade das hifas.

Wisbeck (2003) utilizou um planejamento fatorial 2^2 para estudar a influência do pH nos níveis 4,0 ou 6,0 e do K_{La} nos níveis $15,0 \text{ h}^{-1}$ ou $27,0 \text{ h}^{-1}$ na produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. O pH 4,0 maximizou a concentração de biomassa, a velocidade específica máxima de crescimento e o fator de conversão de substrato em célula. O K_{La} de 27 h^{-1} proporcionou melhores resultados em termos de produtividade em biomassa. A concentração de biomassa e o fator de conversão de substrato em células não foram influenciados pelo K_{La} na faixa testada enquanto que a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade em biomassa sofreram a influência da interação pH e K_{La} .

A influência da agitação na morfologia e produtividade dos fungos filamentosos tem recebido atenção especial, embora a resposta dos fungos a este parâmetro tenha sido bastante variada. A transferência de oxigênio suficiente para ativar as células é um fator crítico em fermentações aeróbias. A reologia do meio de cultivo pode influenciar neste processo de várias formas, proporcionando transferência de oxigênio eficiente somente em regiões onde a agitação é adequada, proporcionando um meio homogêneo (GIBBS *et al.*, 2000).

Burla e colaboradores (1992) observaram um aumento na concentração de biomassa de *P. ostreatus* quando o suprimento de ar de um reator de 2 L foi aumentado de 0,5 para 2 L.min⁻¹. O efeito positivo de uma troca gasosa mais eficiente e uma maior disponibilidade de O₂ sobre o crescimento micelial também foi observado em um reator de 15 L, onde a disponibilidade de O₂ pôde ser modificada variando parâmetros como a pressão para aumentar o oxigênio dissolvido e aplicando um sistema *airlift* para aumentar a troca gasosa entre o micélio e o meio de cultura.

Em um trabalho realizado por Márquez-Rocha e colaboradores (1999), foram avaliadas a influência da agitação, da aeração e da geometria das pás de agitação no crescimento micelial e sobre a morfologia de *Pleurotus ostreatus*. Velocidades específicas de produção de biomassa de 0,036; 0,020 e 0,041 h⁻¹ foram obtidas com uma turbina Rushton (turbina de disco), com uma turbina helicoidal e com a turbina comercial InterMIG, respectivamente. Um aumento da aeração de 0,5 para 1,0 vvm aumentou a velocidade específica de crescimento e a produtividade em células de 0,030 h⁻¹ e 0,059 g.g⁻¹ para 0,036 h⁻¹ e 0,071 g.g⁻¹, respectivamente. No entanto, um novo incremento na aeração para 1,5 vvm causou um decréscimo tanto na velocidade específica de crescimento como na produtividade em células. A velocidade específica de crescimento também é reduzida em 22% quando a agitação é aumentada de 200 para 400 rpm, provavelmente em função de danos causados aos *pellets* como a ruptura e a erosão da superfície. Embora trabalhando com outro fungo da classe dos basideomicetos, Park *et al.* (2002) também observaram um aumento do crescimento micelial de *Cordyceps militaris* quando a aeração foi aumentada de 0,5 para 4 vvm. No entanto, um decréscimo na produção de exopolissacarídeos, associada à mudanças na morfologia dos *pellets* foi observado.

1.2.1.2 Composição do meio de cultivo

Compostos energéticos de carbono são nutrientes primários nos meios de cultivo para produção de cogumelos enquanto que o nitrogênio, embora importante, parece ser secundário para o crescimento do fungo (BISARIA & MADAN, 1983).

Jung *et al.* (2003) avaliaram o crescimento de *P. ostreatus* em cultivo submerso usando um meio adicionado de frutas (maçã, pêra e pêssgo) raladas. A adição das frutas

ao meio controle elevou a concentração de biomassa em até três vezes, que alcançou 9,62 g.L⁻¹ como melhor resultado.

O efeito de meios sintéticos no crescimento micelial e na produção de exopolissacarídeos de vários fungos comestíveis foi avaliado em cultivo submerso usando frascos agitados. Tanto a produção de exopolissacarídeos como a produção de biomassa são fortemente controladas pela composição do meio (KIM *et al.*, 2002).

Oso (1977) avaliou a utilização de várias fontes de carbono para a produção de biomassa de *Pleurotus tuber-regium*. Dentre os monossacarídeos testados, frutose, manose, glicose, xilose, arabinose, sorbose, galactose e ramnose, os melhores resultados em termos de crescimento celular foram obtidos com frutose, seguido por manose, glicose e xilose. Os oligossacarídeos celobiose, maltose, melibiose, sacarose e lactose também foram avaliados e celobiose e maltose foram os únicos oligossacarídeos sobre os quais houve bom crescimento. Os dois polissacarídeos testados, dextrina e amido, mostraram-se ser fontes de carbono prontamente utilizáveis pelo fungo. Dos três açúcares-álcool testados, manitol mostrou os melhores resultados, seguido por sorbitol. Arabitol mostrou-se inadequado para o crescimento celular.

Burns *et al.* (1994) cultivaram *Pleurotus* sp. var. *florida* em frascos agitados contendo meio de cultivo com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, galactose, xilose e lactose), fontes de nitrogênio (asparagina e fenilalanina substituídos pelo nitrogênio inorgânico do tartarato de amônio) e concentrações de fosfato e sulfato. Glicose mostrou-se a melhor fonte de carbono para a produção de exopolissacarídeos da mesma forma que uma alta relação C:N, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada. Os autores também compararam a produção de biomassa e exopolissacarídeos em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 80 mL de meio de cultivo e em reatores de 2, 5 e 20 L. O cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em reatores produziu baixo rendimento em exopolissacarídeo, o que pode ser parcialmente explicado pela deficitária taxa de transferência de massa associada ao crescimento de *pellets* envoltos por uma camada aderente de polissacarídeos.

O efeito de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, uréia, fosfato de amônio, citrato de amônio, nitrato de amônio e nitrato de potássio) sobre o crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* foi estudado por Manu-Tawiah & Martin (1988). A concentração das diferentes fontes foi calculada de forma a fornecer 0,5 g.L⁻¹

de nitrogênio em um meio sintético e em um meio composto por extrato de turfa. Extrato de levedura mostrou ser a melhor fonte de nitrogênio adicionada ao meio de extrato de turfa, enquanto que citrato de amônio propiciou a mais alta concentração de biomassa ($14,7 \text{ g.L}^{-1}$) quando adicionado ao meio sintético. Um aumento na concentração destas fontes de nitrogênio proporcionou um leve aumento na concentração de biomassa. A melhor relação carbono:nitrogênio foi 40:1.

Ertekin & Yildiz (1996), após avaliarem diferentes fontes de nitrogênio (extrato de malte, farinha de trigo e cevada moída) no crescimento micelial de *P. ostreatus*, *P. sapidus* e *P. sajor-caju*, concluíram que *P. ostreatus* é menos influenciado pela relação carbono:nitrogênio do que as outras espécies.

Com o objetivo de otimizar o rendimento e a eficiência da conversão de substrato em biomassa de *Pleurotus tuber-regium* em meio líquido, Wu *et al.* (2003) estudaram a composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio) e a fração de inóculo empregada. O volume de inóculo foi variado de 0,5 a 12 mL de um homogenato micelial. Resultados similares de rendimento em biomassa foram obtidos tanto para 2 como para 12 mL. O crescimento micelial usando glicose e frutose apresentou uma fase *lag* relativamente menor do que aquela obtida quando amido foi utilizado. A utilização do nitrogênio do extrato de levedura foi melhor do que a utilização de nitrogênio de peptona. O ajuste destes parâmetros forneceu um rendimento de aproximadamente 40%, muito mais alto do que os rendimentos já reportados para *P. tuber-regium*. No escalonamento do processo, o meio basal contendo frutose proporcionou rendimento em biomassa maior do que aquele contendo glicose (WU *et al.*, 2003).

Os mesmos autores avaliaram a influência de uma ampla gama de relações C:N (6:1 a 96:1) sobre o rendimento e a composição da biomassa micelial de *Pleurotus tuber-regium*. O crescimento micelial mostrou-se superior quando relações C:N entre 18:1 e 36:1 foram utilizadas, alcançando um valor ótimo em 24:1. O aumento da relação C:N também aumentou o conteúdo de glicanos. Os resultados indicam que a proporção da fonte de carbono em relação à fonte de nitrogênio em um meio de fermentação afeta a biossíntese de polissacarídeos da parede celular do micélio (WU *et al.*, 2004)

Meios de cultivo complexos como mosto de cerveja, extrato de milho contendo sais e glicose ou amido e suco de batata concentrado contendo amido foram avaliados por Solomko & Eliseeva (1988). Os resultados mostraram que os meios contendo amido

foram os mais propícios para o crescimento de *P. ostreatus* e produção de vitaminas do grupo B.

Soro de queijo, um subproduto da indústria de laticínios, como meio de cultivo para *P. ostreatus*, também mostrou estimular o crescimento micelial deste fungo (DI LENA & SERMANNI, 1994).

Os requerimentos nutricionais de *Pleurotus tuber-regium* foram estudados por Fasidi & Olorunmaiye (1994). Dentre os carboidratos testados, glicose foi o mais utilizado, seguido na ordem por manitol, maltose, dextrina e celulose. Quando diferentes fontes de nitrogênio foram testadas, extrato de levedura apresentou os melhores resultados em termos de crescimento micelial, seguido por asparagina, caseína, glicina, e nitrato de cálcio. Nitrato de sódio, nitrato de potássio e sulfato de amônio apresentaram os piores resultados. A melhor razão C:N para o crescimento micelial foi 4:1. Similarmente, tiamina, piridoxina, ácido giberélico, Ca, K, Cu e Zn também mostraram-se estimuladores do crescimento micelial.

Bugarski *et al.* (2002) avaliaram o crescimento micelial de duas linhagens de *P. ostreatus* em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de carboidratos (0,1; 0,2 e 0,3% de Maltex - extrato de malte contendo 55% de maltose e maltotriose e 10% de glicose e frutose). Para ambas as linhagens, as melhores condições de crescimento micelial foram proporcionadas pelo meio de cultivo que continha a maior concentração de açúcar.

A necessidade de fósforo, potássio, magnésio e manganês para o crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* foi estudada por Manu-Tawiah & Martin (1987) em cultivo submerso usando um meio sintético e extrato de turfa. Requerimentos adicionais de fósforo e potássio foram detectados e a suplementação do extrato de turfa com fosfato de potássio, proporcionou um aumento no crescimento micelial. A adição de extrato de levedura e fosfato de potássio no extrato de turfa produziu a maior concentração de biomassa seca ($6,8 \text{ g.L}^{-1}$) dentre as condições testadas. A suplementação deste meio com manganês também proporcionou um leve aumento no crescimento micelial.

Em um trabalho realizado por Rosado *et al.* (2003), a produção de biomassa de duas linhagens brasileiras de *Pleurotus* (*P. ostreatoroseus* Sing. e *P. ostreatus* var. *florida*) foi avaliada em cultivo submerso utilizando o meio POL. Após nove dias de incubação, *P. ostreatus* var. *florida* apresentou uma maior concentração de biomassa do

que a produzida por *P. ostreatoroseus*. Entretanto, *P. ostreatoroseus* produziu uma maior concentração de exopolissacarídeo (EPS) bruto quando comparado à *P. ostreatus* var. *florida*. A baixa concentração de sulfato de amônio no meio de cultura POL parece ter favorecido a produção de exopolissacarídeos por *P. ostreatoroseus*.

Pleurotus ostreatus, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus sajor-caju* e *P. ostreatus* var. *florida* foram avaliados, em conjunto com outras 51 cepas de Basidiomicetos, quanto à produção de exopolissacarídeos e biomassa em cultivo submerso também utilizando o meio POL. Dentre as cepas avaliadas, *Pleurotus sajor-caju* e *P. ostreatus* var. *florida* produziram a maior quantidade de biomassa em sete dias de cultivo, reforçando os dados de boa produtividade em células obtida com este gênero (MAZIERO *et al.*, 1999).

1.3 Potencial terapêutico de *Pleurotus* spp.

Várias são as moléculas responsáveis pelos poderes terapêuticos dos fungos. Como agentes antitumorais destacam-se as fibras dietéticas como os β -D-glicanos, os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas. Dentre os principais compostos com atividade farmacológica, os polissacarídeos complexos, produzidos a partir de nutrientes simples, são os componentes predominantes da parede celular dos fungos e têm atraído especial atenção devido a sua atividade imunomodulatória e antitumoral (LORENZEN & ANKE, 1998).

1.3.1 β -D-glicanos

Os fungos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de estruturas polissacarídicas como componentes da parede celular tais como derivados do amido, glicogênio, pululanas, micodextranas, glicanos com ligações α -(1,3), celulose, glicanos com ligações β -(1,3) e β -(1,6) e ainda α -D-mananas, β -D-mananas, fosfomananas, galactanas, fosfogalactanas, quitina, polissacarídeos contendo N-acetilglicosamina e

heteropolissacarídeos contendo diversos componentes como xilose, arabinose, fucose, ácido glicurônico e ramnose (GORIN & BARRETO-BERGTER, 1983).

Além disso, os fungos da classe dos Basidiomicetos são capazes de excretar polissacarídeos para o meio onde estão sendo cultivados. Vários estudos realizados para caracterizar estes polissacarídeos mostraram tratar-se de unidades de β -(1,3) e β -(1,6) glicanos (COMPERE *et al.*, 1980; GUTIÉRREZ *et al.*, 1995; MAZIERO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004a).

O papel dos β -glicanos em fungos é diverso, dependendo do seu tamanho, estrutura, propriedades físico-químicas e sua localização na célula. O papel principal dos β -glicanos da parede celular é a manutenção da rigidez da parede, dando proteção a esta. Entretanto, a natureza e localização dos β -glicanos da parede celular sugerem a possibilidade de que eles sejam também utilizados como fonte de nutrientes, funcionando como reserva de carbono, como uma consequência da exaustão de nutrientes externos ou de modificações da composição da parede durante a morfogênese (PITSON *et al.*, 1993). Quanto às funções dos exopolissacarídeos, parecem estar associadas à aderência do fungo ao seu substrato, à imobilização de enzimas extracelulares, à prevenção da desidratação da hifa e à reserva de nutrientes excedentes (BURNS *et al.*, 1994).

Dentre os inúmeros polissacarídeos que compõem a estrutura dos basidiomicetos, o mais ativo parece ser o polímero ramificado (1,3), (1,6)- β -D-glicano. Sua estrutura consiste de unidades de glicopiranosil unidas por ligações β -(1,3) ao longo das quais encontram-se dispersas randomicamente, unidades glicopiranosil unidas por ligações β -(1,6) (Figura 1.7) dando ao polímero uma estrutura em forma de crista embora as estruturas e as conformações possam variar, bem como sua atividade (BOHN & BeMILLER, 1995).

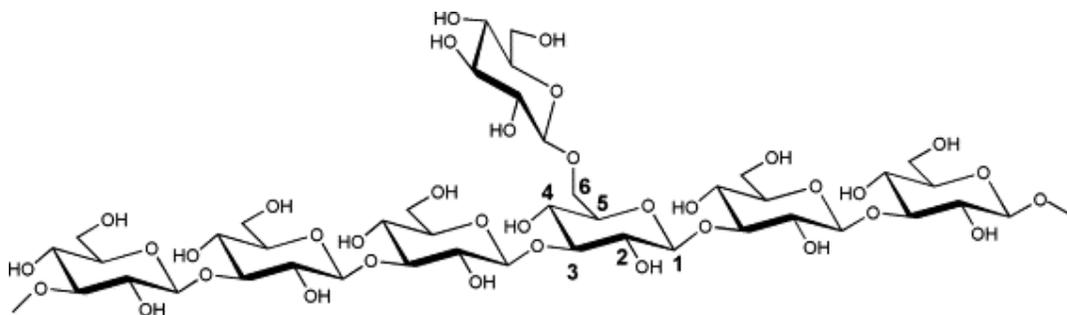


Figura 1.6 Estrutura de um (1,3), (1,6)- β -D-glicano

Fonte: CHAUVEAU *et al.*, 1996.

Vários agentes carcinostáticos de natureza polissacarídica foram desenvolvidos e comercializados a partir da biomassa micelial obtida em cultivo submerso de *Trametes versicolor* (PSK, Krestin; Japão), de corpos frutíferos de *Lentinus edodes* (Lentinan; Japão), *Inonotus obliquus* (Begungin; Rússia), *Agaricus blazei* (EUA) e do caldo fermentado obtido no cultivo submerso de *Schizophyllum comune* (Sonifilan, SPG, Schizophyllan; Japão) (WASSER & WEIS, 1999).

Os (1,3)- β -D-glicanos isolados de fungos e outras fontes possuem essencialmente a mesma estrutura, embora existam diferenças no tamanho e formato das macromoléculas associadas às cadeias laterais, grau de polimerização, distribuição e tamanho das ramificações etc. A estrutura primária do Pleuran, isolado de *Pleurotus ostreatus* é similar à dos β -D-glicanos comumente encontrados em outros Basidiomicetos e Ascomicetos, tais como Lentinan, Scleroglucan e Schizophyllan, parecendo haver diferenças somente quanto à solubilidade.

A Tabela 1.1 sumariza vários exemplos dos efeitos medicinais de várias espécies de *Pleurotus*.

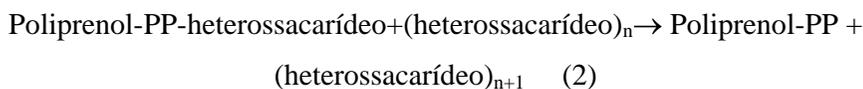
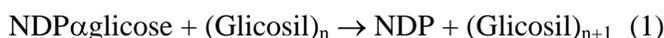
Tabela 1.1 Efeitos medicinais de *Pleurotus* spp.

Efeito medicinal	Fungo	Substância	Referências	
Antimicrobiano	<i>Pleurotus</i> spp.	Micélio	Bianco Coletto (1981)	
		Polissacarídeos	Wang & Wang (1997)	
Antibacteriano	<i>P. ostreatus</i>	β -D-glicanos (pleuran)	Karacsonyi & Kuniak (1994)	
	<i>Pleurotus</i> spp.	-	Noda-Shokukin (1998c)	
Antiviral	<i>Pleurotus</i> spp.	-	Noda-Shokukin (1998a)	
	<i>P. citrinopileatus</i>	polisacarídeos	Zhang <i>et al.</i> (1994 ^a ,b)	
	<i>P. ostreatus</i>	Ubiquitina	Wang & Ng (2000)	
Imunomodulatório	<i>P. ostreatus</i>	Glicanos	Paulik <i>et al.</i> (1992, 1996)	
Antitumoral	<i>P. ostreatus</i>	Glicopeptídeos	Li <i>et al.</i> (1994)	
	<i>P. ostreatus</i>	Basidioma	Zusman <i>et al.</i> (1997)	
	<i>Pleurotus</i> spp.	-	Hidaka & Ikegawa (1998)	
	<i>Pleurotus</i> spp.	-	Suzuki & Ikegawa (1998)	
	<i>P. ostreatus</i>	Basidioma	Bobek <i>et al.</i> (1998a)	
	<i>P. ostreatus</i>	Lectina	Wang <i>et al.</i> (2000)	
	<i>P. ostreatus</i>	β -D-glicanos (pleuran)	Bobek & Galbavy (2001)	
	Antiinflamatório	<i>Pleurotus</i> spp.	-	Noda-Shokukin (1998b)
	Anticolesterolêmico	<i>P. eryngii</i>	Lovastatin	Gunde-Cinerman & Cinerman (1995)
<i>P. ostreatus</i>		Basidioma	Opletal <i>et al.</i> (1997)	
<i>P. cornucopiae</i>		Lovastatin	Krasnopolskaya <i>et al.</i> (1998)	
<i>P. ostreatus</i>		Basidioma	Bobek <i>et al.</i> (1995, 1998b)	
Hemoaglutinante		<i>P. cornucopiae</i>	Lectina	Oguri <i>et al.</i> (1996)
Antioxidante	<i>P. ostreatus</i>	β -D-glicanos (pleuran)	Bobek & Galbavy (2001)	

Fonte: COHEN *et al.* (2002)

1.3.1.1 Síntese de β -glicanos

A formação de novas ligações glicosídicas na biossíntese de β -glicanos envolve a ação de glicosil transferases (glicano sintases). Unidades glicosídicas ativadas são transferidas repetitivamente à cadeia do oligossacarídeo ou polissacarídeo. O substrato doador pode ser tanto um nucleotídeo (como a uridina 5'- β -D-glicopiranosil pirofosfato) como um éster glicosil fosfato de poliprenol (undecaprenol), conforme mostram as equações 1 e 2 (KARNEZIS *et al.*, 2000).



As glicosil-transferases NDP (nucleotídeo difosfato) dependentes são classificadas de acordo com as relações encontradas nas suas seqüências de aminoácidos. Nesta classificação, as polissacarídeos sintases estão dispostas em três famílias, 2, 3 e 5, dentro das 47 famílias de glicosil transferases já conhecidas. Assim, a família 2 de sintases inclui aquelas que produzem os β -glicanos homopolissacarídeos, tais como a celulose, a quitina e os (1,3)- β -glucanos, bem como os β -glicanos heteropolissacarídeos não ramificados. Para cada um destes polímeros, a formação de novas ligações glicosídicas envolve a inversão da configuração α -anomérica das unidades glicosídicas no doador NDP glicosil (KARNEZIS *et al.*, 2000).

O processo de polimerização das cadeias de β -glicanos, assim como de todos os polímeros biológicos envolve três etapas: iniciação, alongamento e terminação da cadeia. As enzimas catalisam o alongamento de polissacarídeos adicionando os sacarídeos repetitivamente ao terminal redutor ou não redutor da cadeia. No primeiro caso, o sacarídeo transferido é ativado no seu terminal redutor e a molécula ativada é liberada na reação. No segundo caso, o alongamento se dá pela repetida transferência da cadeia crescente do polissacarídeo ligado ao undecaprenol pirofosfato para uma unidade

sacarídica. Em outros sistemas, a iniciação da cadeia se dá em um simples monossacarídeo considerado o *primer* (KARNEZIS *et al.*, 2000).

O mecanismo de terminação da cadeia ainda não foi entendido, embora algumas regras já tenham sido sugeridas para alguns poucos organismos (MATTHYSSE *et al.*, 1995). Da mesma forma, ativadores e proteínas auxiliares para a síntese de β -glicanos parecem não obedecer a uma regra geral, conforme mostra a Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Ativadores, cofatores e proteínas auxiliares na síntese de β -glicanos

Organismo	β -glicano	Cátions ativadores	Ativação/inibição	Proteínas auxiliares
Bactérias				
<i>Agrobacterium sp.</i>	(1,3)- β -glicano	?	Fosfatidil etanolamina ativa	Sim, mas não identificadas
<i>Acetobacter xylinus</i>	(1,4)- β -glicano	Ca ²⁺ ativa	GMP cíclico ativa	Proteína ligadora de GMP cíclico
<i>Escherichia coli</i>	(1,2)- β -glicano	Mg ²⁺ ativa	-	Proteína transportadora de glicanos
<i>Streptococcus pyogenes</i>	hialuronato	-	Cardiolipina ativa	-
Oomicetos				
<i>Saprolegnia monoica</i>	(1,3)- β -glicano	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	GTP inibe	?
<i>Phytophthora sojae</i>	(1,3)- β -glicano	Cátions divalentes não ativam	Insensível à GTP	-
Leveduras	Glicanos de leveduras	-	GTP ativa	Proteína Rho 1p
Plantas superiores	calose	Ca ²⁺ ativa	β -glicosídeos ativam (<i>in vitro</i>)	?

Fonte: KARNEZIS *et al.*, 2000.

Os dois tipos de ramificações encontrados nos β -glicanos são gerados por diferentes mecanismos. Os (1,3; 1,6) β -glicanos da parede celular de leveduras e fungos são construídos pela transferência de seções de uma cadeia para formar um ponto de ramificação em outra cadeia. Estas reações são controladas por enzimas ramificadoras [(1,3)- β -glicanosil transferases] (MOUYNA *et al.*, 1998).

1.3.2 Ação antitumoral

O mecanismo carcinostático dos β -D-glicanos é um pouco diferente do mecanismo dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer. Os β -D-glicanos pertencem a uma classe de imunoterapêuticos que inibem ou eliminam o crescimento das células cancerígenas, ativando e reforçando as funções imunológicas do hospedeiro. Isto significa que os polissacarídeos antitumorais estão classificados como modificadores de respostas biológicas, com efeitos colaterais adversos mínimos (MIZUNO, 1999). O efeito do Pleuran (1,3- β -glicano isolado de fungos do gênero *Pleurotus*) parece ser mediado pela ativação dos neutrófilos, macrófagos, monócitos e as células “natural killer” – NK através de receptores CR3 e β -glicanos específicos. Este processo é acompanhado pelo estímulo da produção de citocinas, tais como as TNF- α , interleucina 1 etc., resultando no aumento da imunidade (NOSÁL’OVÁ *et al.*, 2001).

Ikekawa *et al.* (1969) testaram extratos aquosos obtidos de sete linhagens fúngicas, dentre as quais *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus spodoleucus* que apresentaram taxas de regressão do Sarcoma 180 implantado em camundongos de 75,3 e 72,3%, respectivamente.

Yoshioka *et al.* (1971) descreveram o isolamento de frações ativas contra Sarcoma 180 obtidas de um extrato aquoso do basidioma de *Pleurotus ostreatus*. O fracionamento por precipitação com etanol, ultrafiltração e adsorção em DEAE-Sephadex foram efetivos na purificação de quatro frações, duas das quais com ação antitumoral apresentando taxas de inibição do tumor em torno de 90%.

Alguns polissacarídeos ligados a proteínas foram isolados do basidioma de *Pleurotus sajor-caju* por extração fracionada e técnicas cromatográficas. Várias frações

apresentaram atividade antitumoral contra Sarcoma 180, sendo que uma delas, a que continha o menor teor de proteínas, promoveu 100% de inibição e regressão do tumor (ZHUANG *et al.*, 1993).

Várias frações polissacarídicas (solúveis e insolúveis em água) foram extraídas de basidiomas de *Pleurotus citrinopileatus* por ZHANG e colaboradores (1994). Após o fracionamento, a atividade antitumoral das frações contra Sarcoma 180 implantado em camundongos foi avaliada. Dos onze polissacarídeos solúveis em água obtidos, apenas três mostraram altas taxas de inibição do tumor quando comparados com a ação do controle positivo. As taxas de regressão do tumor e de mortalidade também foram baixas. Seis frações contendo polissacarídeos insolúveis em água mostraram resultados excelentes tanto para a taxa de inibição do tumor quanto para a regressão completa do tumor, quando comparados ao controle positivo, podendo ser considerados valiosos modificadores de respostas biológicas.

Mizuno (1999) também avaliou o efeito antitumoral de frações polissacarídicas obtidas do basidioma de treze linhagens de basidiomicetos, dentre os quais *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus citrinopileatus*, cujas frações mais ativas proporcionaram uma inibição do tumor Sarcoma 180, de 100 e 90,1%, respectivamente.

O polissacarídeo pleuran isolado do basidioma de *Pleurotus ostreatus*, administrado em ratos com colite aguda induzida, também mostrou-se efetivo na redução dos danos do colo, indicando a possibilidade do uso deste agente imunomodulador no tratamento da colite ulcerativa (NOSÁL'OVÁ *et al.*, 2001).

Quatro polissacarídeos foram isolados da esclerótia e do micélio de *Pleurotus tuber-regium* por extração com água quente e por ultrasonicação. Todos os quatro polissacarídeos apresentavam glicose como principal monossacarídeo. Os extratos aquosos do micélio apresentaram maior teor de proteínas do que os obtidos da esclerótia. Os polissacarídeos extraídos com água quente exibiram uma maior atividade antitumoral *in vivo* contra Sarcoma 180 implantado em camundongos e *in vitro* contra uma cultura de células do tumor HL-60 do que os polissacarídeos obtidos por ultrasonicação (ZHANG *et al.*, 2004a).

1.3.3 Ação antimicrobiana e antiviral

Segundo Ooi & Liu (1999), fármacos antimicrobianos têm sido empregados profilaticamente e com objetivos terapêuticos. Entretanto, a recente emergência de cepas resistentes a muitos fármacos tem tornado o tratamento complexo. Assim, a atividade antimicrobiana de vários polissacarídeos vem sendo avaliada em termos de eficiência clínica, como alternativas terapêuticas.

Substâncias antibióticas obtidas de fungos do gênero *Pleurotus* podem ser divididas em polissacarídeos de baixo peso molecular, os quais, na maior parte dos casos, também exercem atividade anticancerígena e antiviral, através da estimulação da resposta imunológica do organismo, em metabólitos secundários, principalmente de origem terpenóide e em diferentes derivados protéicos (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Gerasimenya *et al.* (2002) avaliaram extratos obtidos do micélio e do caldo de cultivo obtido em meio líquido, de 14 linhagens de *Pleurotus* quanto a possível produção de substâncias biologicamente ativas. Todas as linhagens manifestaram atividade antimicrobiana nos extratos obtidos do micélio e do basidioma, porém, nenhuma atividade foi observada no caldo de cultivo, indicando baixos níveis de substâncias extracelulares.

Misturas de compostos voláteis extraídos de *P. ostreatus* também demonstraram forte atividade antibacteriana, conforme relatado por Beltran *et al.* (1997).

Garcia *et al.* (1998), ao testar extratos de micélio de *P. ostreatus*, cultivados em grãos de trigo, também verificaram atividade antibacteriana da espécie, contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Bacillus subtilis*, porém não foi encontrada qualquer atividade contra fungos e leveduras.

Esta mesma espécie crescida em cultivo submerso, investigada por Wisbeck *et al.* (2002) apresentou atividade contra a levedura *Candida albicans*, e também contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Já a espécie *P. sajor caju* não apresentou qualquer atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

A extração do caldo de cultivo de *P. griseus* com clorofórmio resultou no antibiótico pleurotin, produzido em escala industrial, que afeta as seguintes bactérias: *Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium*

phlei, *M. smegmatis*, *Photobacterium fischeri* e *Staphylococcus aureus* (GUNDE-CINERMAN, 1999).

Pleuromutilin é um diterpenóide com ação antibacteriana isolado de *P. mutilus*, que atua diretamente sobre o ribossomo, impedindo a síntese de proteínas (LORENZEN e ANKE, 1998).

Gutiérrez *et al.* (1994), estudando a produção de enzimas oxidativas e compostos aromáticos por fungos do gênero *Pleurotus*, observou a presença de ácido benzóico, conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas contra leveduras e bactérias, e de álcool benzílico no caldo de cultivo de *P. ostreatus*.

Gunde-Cimerman (1999) relata ainda que glicopeptídeos com excelentes atividades terapêuticas e fungicidas são produzidas por *P. ostreatus*, sendo aplicados no controle de doenças de plantas agrícolas.

A natureza da ativação dos macrófagos induzida pelos β -1,3-D-glicanos proporciona a estas moléculas efeitos antimicrobianos de largo espectro. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pneumocytis carinii*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania donovani*, *Herpes simplex* etc. são alguns microrganismos que sofrem a ação antimicrobiana de Beta-1,3-D-glicanos. Ao contrário dos compostos antibióticos conhecidos que interferem no metabolismo do patógeno, os β -1,3-D-glicanos agem modificando a resposta do hospedeiro a células de um antígeno (BER, 2004).

Segundo Zhang e colaboradores (2004), polissacarídeos sulfatados tem demonstrado ter atividade antiviral, explicada pela ligação destas moléculas às partículas virais, prevenindo a infecção da célula hospedeira. É plausível que as cargas negativas da cadeia polissacarídica possa interagir com as glicoproteínas positivamente carregadas da superfície viral, minimizando a interação entre o vírus e a célula hospedeira.

Em contraste com os β -D-glicanos solúveis em água e em álcali, Pleuran mostra-se insolúvel em álcali, devido talvez ao seu alto peso molecular e à ocorrência de uma pequena porção (7%) de resíduos interiores com ligações (1,6) e (1,4). Pleuran foi testado quanto à sua atividade imunomodulatória, promovendo a sobrevivência de camundongos suscetíveis à infecção sistemática de *Listeria monocytogenes* e *Haemophilus influenzae* (KARÁCSONYI & KUNIAK, 1994).

Diversos microrganismos são utilizados para testes de estudo sobre atividade antimicrobiana, em função de suas características patogênicas, entre eles *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* (GARCIA *et al.*, 1998; RIBEIRO & SOARES, 1998).

O gênero *Bacillus* inclui bastonetes gram-positivos aeróbios, que ocorrem em cadeias. A maioria dos membros desse gênero consiste em microrganismos saprófitas. A espécie *B. subtilis* é uma bactéria aeróbia esporulada, patogênica, causadora de diarreia infantil, de infecções hospitalares e intoxicações alimentares, principalmente aquelas ligadas à lactose. Pertencentes à família *Bacillaceae*, são usadas na produção de enzimas industrialmente importantes e também na produção do antibiótico bacitracina (TORTORA *et al.*, 2002).

As espécies do gênero *Escherichia*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, da qual a *E. coli* é membro, são bacilos móveis gram-negativos, anaeróbios facultativos, com ou sem cápsula (PELCZAR *et al.*, 1996; TORTORA *et al.*, 2002). A *E. coli* é bastante comum na microbiota endógena do cólon de vertebrados, incluindo o homem, e por isso sua presença em água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal. Podem ser patógenos oportunistas quando transferidas do trato intestinal para outras partes do corpo. Também podem produzir toxinas que causam distúrbios gastrintestinais, denominados coletivamente gastroenterite por *E. coli*. (PELCZAR *et al.*, 1996; TORTORA *et al.*, 2002).

C. albicans é uma levedura oportunista, encontrada normalmente em pequeno número, na pele íntegra saudável e também colonizando membranas das mucosas oral, vaginal, gastrointestinal e trato respiratório. Entretanto, quando há queda da homeostasia, pode haver um super-crescimento de *C. albicans*, causado pela destruição de seus competidores naturais, devido ao uso de antibióticos, por exemplo, ou uma queda substancial da resistência imunológica do hospedeiro, como no caso de pacientes portadores de AIDS, podendo resultar em doenças nos locais habitados pelo microrganismo (TORTORA *et al.*, 2002).

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos e manutenção

Pleurotus ostreatus, obtido da DSM - Deutsche Sammlung van Mikroorganismen und Zellkulturen sob o código DSM 1833 foi mantido em meio TDA (Trigo Dextrose Ágar), com a seguinte composição (FURLAN *et al.*, 1997): 20 g de glicose, 15 g de ágar e 1 L de extrato de trigo, com pH variando de 6,0 a 6,5.

Para a obtenção do extrato de trigo, os grãos de trigo foram imersos em água destilada na proporção 1:2 (g/mL) e fervidos por 10 minutos, após os quais os grãos de trigo foram filtrados em papel filtro comum. O líquido resultante é o extrato de trigo.

A cultura foi mantida sob refrigeração (4°C) e os repiques feitos a cada três meses.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados os microrganismos *Escherichia coli* CCT 1371, *Bacillus subtilis* CCT 1940 e *Candida albicans* CCT 0776. *E. coli* e *B. subtilis* foram mantidos em placas de Petri contendo meio NA (5,0 g.L⁻¹ de peptona; 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 15 g.L⁻¹ de ágar). O meio YMA (3,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5,0 g.L⁻¹ de peptona, 10,0 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar) foi utilizado para manutenção da *C. albicans*. Os repiques foram realizados mensalmente. A escolha dos microrganismos teste foi realizada em função das diferentes características apresentadas por cada espécie: *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva e *C. albicans*, uma levedura.

2.2 Avaliação do uso de meios de cultivo alternativos para produção de biomassa de *P. ostreatus*

2.2.1 Meios de cultivo

Os meios de cultivo líquidos avaliados foram: meio POL (MAZIERO *et al.*, 1999; WISBECK *et al.* 2002; ROSADO *et al.* 2002), contendo 5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de glicose, pH 6,0 a 6,3; meio POL-MIL, contendo 15 g.L⁻¹ de água de maceração do milho (fornecida por CORN Products do Brasil), 5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 20 g.L⁻¹ de glicose, pH 6,5-7,0 e o meio TD composto de extrato de trigo (item 2.1) e 20 g.L⁻¹ de glicose, pH 6,0 a 6,5. A concentração de água de maceração de milho utilizada foi definida de forma a manter a mesma concentração de nitrogênio presente no meio POL. A composição média da água de maceração de milho utilizada encontra-se no Anexo I.

2.2.2 Condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio a ser avaliado (meio TD, meio POL-MIL ou meio POL) esterilizado a 121°C, inoculados com dois discos de ágar de 15 mm de diâmetro colonizados com o micélio fúngico. Os frascos foram agitados em agitador B. BRAUN, modelo CERTOMAT U, com agitação recíproca de 120 min⁻¹ e a temperatura foi controlada em 30°C, num período de 12 a 14 dias, conforme o experimento. A cada 48 horas, três frascos (triplicata) foram retirados para quantificação da biomassa e do substrato consumido.

As amostras coletadas foram filtradas em papel Whatman nº1 e as células obtidas foram utilizadas para medida do crescimento celular, conforme item 2.7.1. O filtrado resultante após a retirada das células foi utilizado para medida de concentração de glicose, conforme item 2.7.2.

Os resultados foram avaliados em termos de produtividade máxima em biomassa.

2.3 Suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose

2.3.1 Meio de cultivo

Neste experimento, foi avaliado o efeito da concentração de glicose sobre a produção de biomassa de *P. ostreatus*. Para tanto, utilizou-se o extrato de trigo (item 2.1) acrescido de 5, 10, 15 ou 20 g.L⁻¹ de glicose.

2.3.2 Condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 2.2.2 e avaliados em termos de produtividade máxima em biomassa e fator de conversão de substrato em biomassa.

2.4. Definição da melhor composição do meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos

2.4.1 Meios de cultivo

De maneira a determinar a fonte de nitrogênio e sua respectiva concentração e a concentração de glicose que proporcionassem, dentro das condições avaliadas, a melhor produção de biomassa e polissacarídeos, neste experimento utilizou-se o extrato de trigo suplementado com uma fonte orgânica de nitrogênio (extrato de levedura - YE ou água de maceração de milho - MIL) e/ou uma fonte inorgânica (sulfato de amônio), variando-se a concentração de glicose em 20 e 40 g.L⁻¹, conforme planejamento fatorial descrito na Tabela 2.1. O planejamento experimental foi realizado analisando-se quatro fatores (variáveis) em dois níveis (2⁴), em duplicata, totalizando 34 ensaios, incluindo o ponto central (experimento 17 da Tabela 2.2), mostrados nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1 Fatores avaliados no planejamento fatorial dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos. Os índices (-), (0) e (+) indicam o nível de cada fator como inferior, central e superior, respectivamente.

Fatores	Níveis		
	-	0	+
Fonte orgânica de nitrogênio	MIL	-	YE
Concentração da fonte orgânica de nitrogênio (g.L ⁻¹)	2,0 (YE) ou 10,0 (MIL)	0 (YE ou MIL)	5,0 (YE) ou 20,0 (MIL)
Concentração da fonte inorgânica de nitrogênio - (NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	0	2,5	5
Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	20,0	30,0	40,0

Tabela 2.2 Planejamento fatorial dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos.

Experimento	Fonte orgânica de nitrogênio	Concentração de MIL ou YE (g.L ⁻¹)	Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	Concentração inicial de glicose (g.L ⁻¹)
01	YE*	5	5	40
02	YE	5	5	20
03	MIL**	20	5	40
04	MIL	20	5	20
05	YE	2	5	40
06	YE	2	5	20
07	MIL	10	5	40
08	MIL	10	5	20
09	YE	5	0	40
10	YE	5	0	20
11	MIL	20	0	40
12	MIL	20	0	20
13	YE	2	0	40
14	YE	2	0	20
15	MIL	10	0	40
16	MIL	10	0	20
17	nenhuma	0	2,5	30

*YE – extrato de levedura

**MIL – água de maceração de milho

2.4.2 Condução dos ensaios

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 2.2.2, com exceção de que foram realizados em duplicata.

Os resultados foram avaliados em termos de produtividade máxima em células, concentração máxima de células, fator de conversão de substrato em células e produtividade máxima em polissacarídeos.

2.5. Avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de $K_L a$ inicial

2.5.1 Meio de cultivo

Neste experimento foi utilizado o meio de cultivo selecionado no item 2.4.

2.5.2 Condução dos ensaios

Os experimentos foram conduzidos em regime descontínuo e realizados em biorreator de mistura completa B. BRAUN (modelo BIOSTAT B), com dorna de vidro de capacidade útil de 5L (160 x 250mm) e volume de trabalho de 4L.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio TD (item 2.2.1). Os frascos foram inoculados com 2 discos de ágar de 15 mm de diâmetro contendo o micélio fúngico. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30°C em agitador B.BRAUN, modelo CERTOMAT U, com agitação recíproca de 120 min^{-1} , por seis dias. A suspensão de células obtida após este tempo foi filtrada em peneira previamente esterilizada e aproximadamente 30 g destas células (úmidas) foram adicionadas a 4L do meio de cultivo selecionado no item 2.4, contidos no biorreator.

O pH foi mantido constante em 4,0, através da adição automática de soluções de NaOH 6N e HCl 6N. A leitura do pH foi realizada por um sensor de pH (modelo 405/DPAS-K8S/325, INGOLD ELECTRODES). A temperatura de incubação foi

controlada em 30°C, por um sensor de temperatura modelo PT 100, B.BRAUN. O k_La inicial de 10,2 h⁻¹ foi obtido através do controle da vazão de ar em 1L/min e da frequência de agitação em 330 rpm. O k_La inicial de 19,3 h⁻¹ foi obtido através do controle da vazão de ar em 2L/min e da frequência de agitação em 400 rpm. A pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO_2) foi obtida através de um sensor (INGOLD). A agitação do sistema foi efetuada por um rotor ligado a uma haste com três turbinas de 63 mm de diâmetro contendo seis pás planas, estando a primeira turbina situada imediatamente acima do anel dispersor de ar e as demais dispostas a 75 mm de distância entre si.

Na preparação do sistema, o biorreator contendo o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a gás a 121°C por 20 minutos.

O sistema possuía, ainda, um dispositivo circular interno destinado a retirar o micélio fúngico aderido às paredes internas do biorreator. Este dispositivo era acionado ocasionalmente, quando o acúmulo de micélio era percebido visualmente.

A Figura 2.1 mostra o esquema do biorreator utilizado.

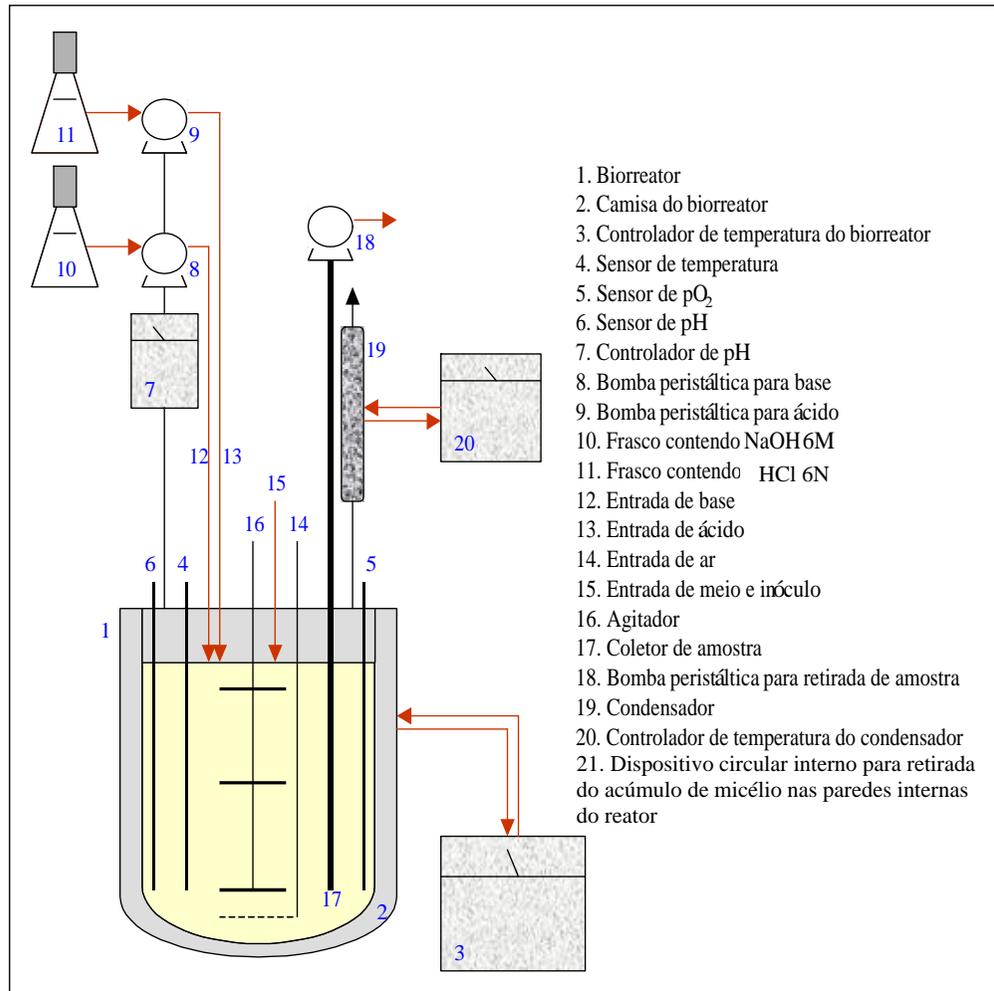


Figura 2.1 Esquema do biorreator utilizado nos experimentos.

Os resultados foram analisados em termos de produtividade máxima em biomassa, polissacarídeos e exopolissacarídeos.

2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do micélio e do caldo de cultivo de *P.ostreatus*

Dois diferentes extratos obtidos do micélio de *P. ostreatus* cultivado no meio selecionado no item 2.4 (EI e EP) e o caldo bruto de 14 dias de cultivo de *P. ostreatus* (CC), cultivado conforme o item 2.2.2, foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

2.6.1. Preparo dos extratos

2.6.1.1 Extrato EI – Este extrato foi preparado pela infusão aquosa a quente (100 °C) de 30 g de micélio fresco obtido do cultivo de *P. ostreatus* no meio selecionado no item 2.4, em 27 g de água, deixando-se em repouso durante 1 hora. Após este tempo, o extrato foi filtrado a vácuo em papel Whatman nº1 e o filtrado resultante foi utilizado para análise da atividade antimicrobiana.

2.6.1.2 Extrato EP – Este extrato foi obtido pela ressuspensão em água dos polissacarídeos extraídos do micélio fresco de *P. ostreatus*, conforme metodologia descrita no item 2.7.3.2, cultivado no meio selecionado no item 2.4. A solução de polissacarídeos obtida foi diluída para uma concentração de 1 g.L⁻¹, a qual foi utilizada para análise da atividade antimicrobiana.

2.6.1.3 Caldo de cultivo bruto CC – Após 14 dias de cultivo de *Pleurotus ostreatus* no meio selecionado no item 2.4, as células de *P. ostreatus* foram separadas do meio de cultivo por filtração a vácuo em papel filtro Wathman nº1 e o caldo bruto resultante foi utilizado para análise da atividade antimicrobiana.

2.6.2. Ativação dos microrganismos teste e preparo do inóculo

Tubos de ensaio de 20 mL contendo 5 mL do meio de cultivo adequado para cada microrganismo teste (NA para *B. subtilis* e *E. coli* e YMA para *C. albicans*) esterilizados a 121°C, por 20 min, foram inoculados com uma alçada de células de cada microrganismo e incubados a 37 °C (*E. coli*) ou 28°C (*B. subtilis* e *C. albicans*) sob agitação recíproca de 220 min⁻¹, durante 24 horas em incubadora CERTOMAT U, B. Braun. 0,5 mL da suspensão de células resultante foram adicionados a novos tubos contendo 5 mL do meio de cultivo adequado, previamente esterilizados. Os tubos foram incubados a 37 °C (*E. coli*) ou 28 °C (*B. subtilis* e *C. albicans*) sob agitação recíproca de 220 min⁻¹, durante 24 horas em incubadora CERTOMAT U, B. A suspensão de células resultante foi utilizada como inóculo no experimento de avaliação da atividade antimicrobiana.

2.6.3 Condução dos ensaios

Tubos de ensaio de 20 mL contendo 2,5 mL do meio de cultivo adequado para cada microrganismo teste duas vezes concentrado foram adicionados de 2,5 mL do extrato EI, EP ou do caldo de cultivo bruto (CC) e esterilizados a 121°C, por 15 min. A mistura foi inoculada com 0,5 ml de uma suspensão de células de cada microrganismo teste (inóculo, item 2.6.2) e incubada a 37 °C (*E. coli*) ou 28 °C (*B. subtilis* e *C. albicans*) sob agitação recíproca de 220 min⁻¹, durante 24 horas. Foram também elaborados cultivos controle, compostos por tubos de ensaio contendo os microrganismos teste em seus respectivos meios de cultivo, sem a adição dos extratos, e mantidos sob as mesmas condições dos cultivos teste.

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da medida de inibição do crescimento celular dos microrganismos teste, que foi detectada mediante a leitura da absorvância da suspensão de células obtida no cultivo dos microrganismos teste, em espectrofotômetro (LKB) a 460 nm, comparado com a leitura da absorvância do cultivo controle. A atividade antimicrobiana foi verificada quando os valores de absorvância dos cultivos teste, contendo extratos, foram significativamente inferiores aos valores de absorvância dos cultivos controle. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo método gravimétrico.

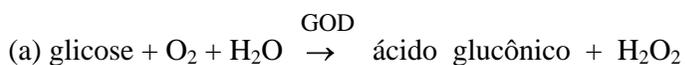
Nos ensaios em frascos agitados (ensaios descritos nos itens 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5), a cada 48 horas, toda a biomassa contida no frasco Erlenmeyer foi filtrada em papel Whatman nº1, previamente seco por 24h a 60°C. A massa obtida após secagem por 48 h a 60°C, foi dividida pelo volume de meio constante do frasco e o resultado apresentado em g.L⁻¹.

Nos ensaios em biorreator, uma amostra de aproximadamente 20 mL foi retirada a cada 48 h e foi submetida ao mesmo tratamento descrito acima.

2.7.2 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 glicônico e água oxigenada (a). Em presença de peroxidase (POD), H₂O₂ produz o acoplamento oxidativo 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:



As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro (modelo LKB) a 505nm. O procedimento completo é descrito em seguida:

- . as amostras foram diluídas em água deionizada de modo a obter-se uma solução de glicose com concentração entre 0,1 e 1 g.L⁻¹;
- . a 10 µL desta solução diluída foi adicionado 1,0 mL de reativo GOD-POD;
- . a mistura foi incubada em estufa a 37°C por 20 minutos;
- . as medições de absorvância foram realizadas a 505nm, sendo o “branco” constituído de 1 mL de reativo GOD-POD e 10 µL de água;
- . para obtenção da “curva padrão”, 10µL de soluções padrão, contendo 0,1, 0,5, 0,8 e 1 g.L⁻¹ de glicose foram adicionados a 1,0 mL de reativo GOD-POD.

Com base nas leituras de absorvância obtidas com os padrões, foi definida uma equação, por regressão linear, através da qual foram calculadas as concentrações de glicose nas amostras. Todas as análises foram realizadas em duplicata para cada amostra. Uma curva padrão para a medida da concentração de glicose pode ser encontrada em anexo (Anexo A, Figura A.1).

2.7.3 Concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos

2.7.3.1 Extração do exopolissacarídeo do caldo de cultivo

Uma fração do caldo de cultivo, após a separação da biomassa, foi adicionada de etanol comercial (96%) resfriado a 8°C, na proporção etanol:amostra 4:1 (v/v). Após 48h sob refrigeração (4°C), para precipitação do exopolissacarídeo, a amostra foi centrifugada a 5500 min⁻¹ (5039 g), por 10 minutos (HWANG *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2001; MIZUNO *et al.*, 1999; SONG *et al.*, 1998).

O exopolissacarídeo precipitado foi ressuspenso em água destilada e a concentração de açúcares solúveis totais foi determinada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

2.7.3.2 Extração do polissacarídeo da biomassa micelial

O micélio foi separado do meio de cultivo através de filtração à vácuo em papel Whatman nº1. Uma fração da biomassa micelial obtida foi lavada com etanol comercial (96%), na proporção de 1:2 (peso de biomassa:volume de álcool), para eliminar os componentes de baixo peso molecular (BEROVIC *et al.*, 2003). A biomassa foi novamente filtrada para eliminar o etanol remanescente e os polissacarídeos foram extraídos pela fervura da biomassa em cinco volumes de água, por 4 horas. A suspensão resultante foi filtrada em papel Wathman nº 1 e o filtrado foi tratado com etanol comercial (96%) resfriado a 8°C, na proporção etanol:amostra 4:1 (v/v). Após 48 h sob refrigeração (4°C), para precipitação do polissacarídeo, a amostra foi centrifugada a 5500 min⁻¹ (5039 g) por 10 minutos e os polissacarídeos precipitados foram ressuspensos em água destilada e a concentração de açúcares solúveis totais foi determinada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

2.7.3.3 Medida da concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos pelo método fenol-sulfúrico

As concentrações de polissacarídeos e de exopolissacarídeos, após a extração do micélio e do caldo de cultivo, respectivamente, foram medidas indiretamente através da determinação de açúcares solúveis pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 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; DUBOIS *et al.*, 1956). 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. Deixa-se reagir por 20 min em temperatura entre 25 e 30°C e mede-se a absorvância em espectrofotômetro, a 490 nm. Para o preparo da

curva padrão, substituiu-se a amostra por 0,5 mL de soluções padrão de glicose com concentrações variando de 0,01 a 0,1 g.L⁻¹. O equipamento é calibrado ($ABS_{490}=0$) com uma solução na qual a amostra é substituída por água.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, foi construída uma curva de calibração (Anexo A, Figura A.2) cuja equação calculada por regressão linear permitiu calcular a concentração de açúcares solúveis totais nas amostras. Todas as análises foram realizadas em duplicata, para cada amostra.

2.7.4 Concentração de oxigênio dissolvido

Durante os cultivos realizados em biorreator, a pressão parcial de oxigênio dissolvido foi monitorada através de eletrodo polarográfico esterilizável INGOLD.

2.7.4.1 Princípio de funcionamento do eletrodo

O eletrodo opera com princípio polarográfico e consiste de um ânodo de prata e um cátodo de platina, que são separados do meio de cultivo por uma membrana polimérica (teflon/silicone), permeável ao gás (oxigênio). O ânodo e o cátodo são conectados condutimetricamente por um eletrólito (solução de KCl), que forma uma fina camada entre a membrana e o cátodo.

Com uma voltagem adequada de polarização, o oxigênio, que se difunde através da membrana em direção ao cátodo, é reduzido. Esta reação química produz uma corrente elétrica, que é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio. As reações são as seguintes:



2.7.4.2 Procedimento de calibração do eletrodo

Para a calibração do eletrodo, passou-se uma corrente de nitrogênio, até que todo o oxigênio fosse expulso. Isto é verificado através da estabilização da leitura da pressão

parcial de oxigênio (pO_2) em valores próximos a 0% de saturação em oxigênio. Neste momento definiu-se 0% de saturação de O_2 .

A seguir, alterou-se a corrente, passando-se ar no sistema. No momento da saturação do meio com ar, considerou-se o valor obtido como 100% de saturação.

Este procedimento foi feito por pelo menos três vezes, no próprio meio de cultivo, após esterilização, nas condições de operação (pH e temperatura).

2.7.4.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) inicial foi determinado com base no método “gassing-out”, descrito por WISE (1951), citado por RAINER (1990), que prevê a utilização de eletrodos com princípio polarográfico para medida da pressão parcial de oxigênio. Este método indireto, ou estático, por ser realizado na ausência de células, tem como princípio, medir a absorção de oxigênio em uma solução.

Inicialmente, o biorreator foi preenchido com o meio de cultivo e as condições de operação foram ajustadas. Em seguida, a concentração de oxigênio dissolvido no líquido foi reduzida a zero pela passagem de nitrogênio. Neste momento, foi reiniciada a aeração do meio e registrada a variação da concentração de oxigênio dissolvido em relação ao tempo.

A Equação 2.1 descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

$$dC/dt = k_L a (C^* - C) \quad (2.1)$$

onde C^* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)

C - concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)

$$\int_{C=0}^{C=C^*} dC / (C^* - C) = \int_{t=0}^{t=t} k_L a . dt \quad (2.2)$$

Rearranjando e integrando a Equação 2.2 no intervalo de $t=0$ a $t=t$, temos:

$$\ln \frac{C^* - C}{C^*} = -k_L a t \quad (2.3)$$

ou ainda

$$\ln(1 - C/C^*) = -k_L a t \quad (2.4)$$

A Equação 2.4 apresenta uma correlação linear entre o $\ln(1 - C/C^*)$ e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de $k_L a$. No entanto, como a determinação da concentração de oxigênio na saturação não é linear próximo a 0 e 100% de saturação, foram definidos os seguintes limites de integração:

$$t=0; C=\alpha.C^*$$

$$t=t; C=\beta.C^*$$

Portanto:

$$\ln(C^* - \beta.C^*) / (C^* - \alpha.C^*) = -k_L a t \quad (2.5)$$

$$\ln(1 - \beta) / (1 - \alpha) = -k_L a t \quad (2.6)$$

onde α é 10% da concentração de saturação em oxigênio e β varia de 10 a 80% da concentração de saturação em oxigênio.

2.8 Metodologias utilizadas nos cálculos

Para os cálculos apresentados a seguir, uma função polinomial de 4º ou 5º ordem foi ajustada aos dados experimentais obtidos, utilizando o programa gráfico Microsoft EXCEL. Valores de X, S e dX/dt foram obtidos em intervalos de 0,3 dias.

2.8.1 Fatores de conversão

2.8.1.1 Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de substrato em biomassa foi definido como :

$$Y_{X/S} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{S_0 - S_{Xm\acute{a}x}} \quad [\text{g}\cdot\text{g}^{-1}] \quad (2.7)$$

onde $X_{m\acute{a}x}$ e $S_{Xm\acute{a}x}$ representam a concentração de biomassa e a concentração de substrato, respectivamente, no ponto onde a derivada da função polinomial de X em relação a t (dX/dt), ajustada aos pontos experimentais é igual a zero e X_0 e S_0 representam a concentração de biomassa e a concentração de substrato, respectivamente, no tempo zero.

2.8.1.2 Fator de conversão de substrato em exopolissacarídeo ($Y_{E/S}$)

O fator de conversão de glicose em exopolissacarídeo foi assim definido:

$$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_0}{S_0 - S_f} \quad [\text{g}\cdot\text{g}^{-1}] \quad (2.8)$$

onde E_f e S_f representam a concentração de exopolissacarídeos e a concentração de substrato, respectivamente, no tempo final de cultivo, onde o processo foi interrompido, e E_0 e S_0 representam a concentração de exopolissacarídeos e a concentração de substrato, respectivamente, no tempo zero.

2.8.1.3 Fator de conversão de substrato em polissacarídeo ($Y_{PS/S}$)

O fator de conversão de substrato em polissacarídeo foi assim definido:

$$Y_{PS/S} = \frac{PS_f - PS_0}{S_0 - S_f} \quad [\text{g}\cdot\text{g}^{-1}] \quad (2.9)$$

onde PS_f e S_f representam a concentração de polissacarídeos e a concentração de substrato, respectivamente, no tempo final de cultivo, onde o processo foi interrompido, e PS_0 e S_0 representam a concentração de polissacarídeos e a concentração de substrato, respectivamente, no tempo zero.

2.8.1.4 Relação entre exopolissacarídeos e a biomassa ($Y_{E/X}$)

A relação entre a concentração de exopolissacarídeos excretados para o meio de cultivo e a biomassa gerada foi assim definida:

$$Y_{E/X} = \frac{E_f - E_0}{X_f - X_0} \quad [\text{mg.g}^{-1}] \quad (2.10)$$

onde E_f e X_f representam a concentração de exopolissacarídeos e a concentração de biomassa, respectivamente, no tempo final de cultivo, onde o processo foi interrompido, e E_0 e X_0 representam a concentração de exopolissacarídeos e a concentração de biomassa, respectivamente, no tempo zero.

2.8.1.5 Relação entre polissacarídeos e a biomassa (PSX)

A relação entre a concentração de polissacarídeos presentes na biomassa micelial e a biomassa gerada foi assim definida:

$$PSX = \frac{\text{massa de polissacarídeos extraída}}{\text{massa seca de células submetida à extração}} \quad [\text{mg.g}^{-1}] \quad (2.10)$$

2.8.2 Produtividades

2.8.2.1 Produtividade total em biomassa (P_X)

$$P_X = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_{Xm\acute{a}x}} \quad [\text{g.L.dia}^{-1}] \quad (2.12)$$

onde $X_{m\acute{a}x}$ representa a concentração de biomassa no ponto onde a derivada da função polinomial de X em relação a t (dX/dt), ajustada aos pontos experimentais é igual a zero, X_0 representa a concentração de biomassa no tempo zero e $t_{Xm\acute{a}x}$ representa o tempo onde X  máximo e $dX/dt=0$.

2.8.2.2 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xm\acute{a}x}$)

Usando os dados obtidos com a função polinomial ajustada aos pontos experimentais de X em relação a t, valores de produtividade foram calculados em intervalos de 0,3 dias. O valor máximo obtido foi definido como a produtividade máxima em biomassa.

$$P_{Xm\acute{a}x} = \frac{X - X_0}{t} \quad [\text{g.L.dia}^{-1}] \quad (2.13)$$

Na equação 2.13, X representa a concentração de biomassa no tempo t, X_0 representa a concentração de biomassa no tempo zero e t representa o tempo no instante t.

2.8.2.3 Produtividade global em exopolissacarídeo (P_E)

A produtividade global em exopolissacarídeo foi assim definida:

$$P_E = \frac{E_f - E_0}{t_f} \quad [\text{g.L.dia}^{-1}] \quad (2.14)$$

onde E_f representa a concentração de exopolissacarídeo no tempo final do cultivo, onde o processo foi interrompido, E_0 representa a concentração de polissacarídeos no tempo zero e t_f representa o tempo final do cultivo, quando o processo foi interrompido.

2.8.2.4 Produtividade global em polissacarídeo (P_{PS})

A produtividade global em polissacarídeo foi assim definida:

$$P_{PS} = \frac{P_{Sf} - P_{S0}}{t_f} \quad [\text{g.L.dia}^{-1}] \quad (2.16)$$

onde PS_f representa a concentração de polissacarídeos no tempo final do cultivo, onde o processo foi interrompido, PS_0 representa a concentração de polissacarídeos no tempo zero e t_f representa o tempo final do cultivo, quando o processo foi interrompido.

2.8.3 Velocidades específicas de crescimento celular

Para o cálculo das velocidades específicas de crescimento celular (μ_X), derivou-se a equação da função polinomial de X em função de t ajustada aos pontos experimentais obtidos, calculou-se a derivada em intervalos de 0,3 dias e dividiu-se o valor da derivada pelo valor da concentração celular correspondente àquele tempo, segundo a equação 2.17. Um exemplo deste procedimento é apresentado no Anexo F.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{dia}^{-1}) \quad (2.17)$$

Com o acompanhamento cinético da concentração celular, a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{X\text{máx}}$), foi calculada traçando-se curvas, relacionando os logaritmos neperianos das concentrações celulares, obtidas com os dados da curva ajustada aos pontos experimentais, com os seus respectivos tempos de amostragem (equação 2.18). Neste gráfico, a fase exponencial apresenta um comportamento linear, sendo o coeficiente angular desta reta, o próprio valor de $\mu_{X\text{máx}}$ (Anexo E, Figura E.4).

$$\ln X = \mu_X \cdot t \quad (2.18)$$

2.9 Análises estatísticas

As replicatas foram avaliadas através do teste estatístico para rejeição de valores desviantes denominado Teste 'Q' de Dixon, com nível de confiança de 95% (r_{10}), de acordo com RORABACHER (1991). A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados obtidos nos experimentos descritos nos itens 2.2, 2.3 e 2.5 foi determinada através do teste de Análise de Variância (ANOVA), realizado no programa Microsoft EXCEL, com nível de significância de 0,5 %. O planejamento experimental utilizado no experimento descrito no item 2.4 foi avaliado no programa STATISTICA®6.0.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação do uso de meios de cultivo alternativos para produção de biomassa de *P. ostreatus*

Neste experimento, dois meios de cultivo, TD e POL-MIL (descritos no item 2.2.1) foram avaliados quanto à produtividade máxima em biomassa e ao fator de conversão de substrato em células. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com o meio POL (controle), tradicionalmente citado na literatura para obtenção de polissacarídeos de *Pleurotus* spp (CAVAZONNI e ADAMI, 1992; BURNS, 1994; MAZIERO, 1999; WISBECK, 2003). Os resultados que serão apresentados são os valores médios obtidos das curvas de concentração de biomassa e substrato em função do tempo de cultivo, traçadas para cada uma das replicatas.

Utilizando o meio POL, a produtividade total em biomassa ($P_X=0,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi alcançada em aproximadamente 11 dias de cultivo, quando a concentração celular era em torno de $7,3 \text{ g.L}^{-1}$. A produtividade máxima em biomassa ($P_{X\text{máx}}=0,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), por sua vez, foi alcançada em 9,5 dias de cultivo, para uma concentração de biomassa igual a $6,8 \text{ g.L}^{-1}$. Valores inferiores foram encontrados por CORRÊA *et al.* (2003) utilizando o mesmo meio de cultivo, porém em frascos Duran de 2 L, alcançando uma produtividade máxima em biomassa de $0,49 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, em 6 dias de cultivo. Maziero *et al.* (1999) avaliaram 48 linhagens de Basideomicetos encontrados no Brasil também em meio POL contendo 39 g.L^{-1} de glicose. Dentre as linhagens avaliadas, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus* sp. var. *florida* alcançaram concentrações de biomassa de 8,5; 4,5; 9,0; 10,39 e $11,72 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, em 14 dias de cultivo. O resultado encontrado para *Pleurotus ostreatus* mostra-se inferior ao obtido neste trabalho, tendo como diferença a temperatura de incubação utilizada (25°C) e a concentração inicial de glicose (39 g.L^{-1}). As demais linhagens apresentam valores de produtividade total próximas às encontradas neste trabalho.

A Figura 3.1 mostra a produção de biomassa (X) de *Pleurotus ostreatus* obtida em meio POL e o consumo de glicose (S) em função do tempo de cultivo. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo B – Tabela B1.

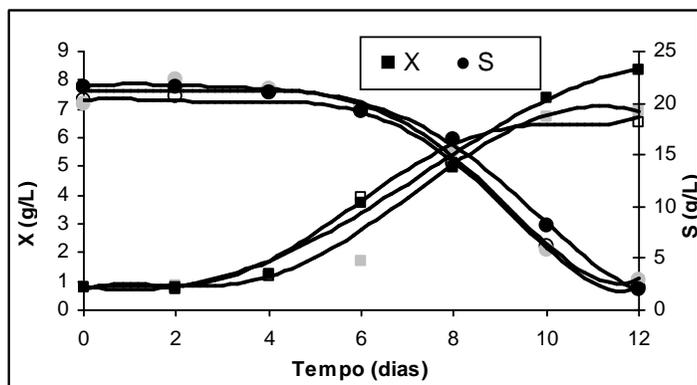


Figura 3.1 Variação das concentrações de substrato (S) e de biomassa (X) de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio POL, para as triplicatas avaliadas.

O meio de cultivo POL apresenta em sua composição além de micronutrientes, extrato de levedura e peptona, como fonte de vitaminas e aminoácidos. Estes nutrientes representam aproximadamente 45% do custo do meio de cultivo, encarecendo-o quando se objetiva a transferência de tecnologia para o setor industrial. Com o intuito de viabilizar economicamente a produção de biomassa, testou-se os meios alternativos TD, a base de extrato de trigo e glicose e POL-MIL, que utiliza a água de maceração de milho (um resíduo da indústria do milho, comumente denominado milhocina) em substituição à peptona e ao extrato de levedura, componentes do meio POL (item 2.2.1). A redução de custos obtida é elevada, uma vez que 1 kg de extrato de levedura (BIOBRAS) custa R\$217,32 (Quilab Comércio de Materiais para Laboratórios Ltda) e 1 kg de milhocina custa apenas R\$0,50 (CORN Products do Brasil).

Quando o meio TD foi utilizado, a produtividade total em biomassa ($P_x=0,92 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) foi alcançada em aproximadamente 10 dias de cultivo, quando a concentração de biomassa (X) atingiu o valor de $10,6 \text{ g.L}^{-1}$. A produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{\text{máx}}}$)

de $1,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foi alcançada em aproximadamente 5 dias de cultivo, quando a concentração de biomassa (X) era de $8,76 \text{ g.L}^{-1}$.

O mesmo meio TD acrescido de ágar (TDA – Trigo Dextrose Ágar) contendo 20 g.L^{-1} de glicose foi avaliado por Furlan *et al.* (1997) proporcionando elevada velocidade de crescimento micelial de fungos do gênero *Pleurotus*. Lomberh e colaboradores (2003) também avaliaram 30 espécies de cogumelos medicinais quanto ao tempo de cultivo ideal para obtenção de inóculo fisiologicamente ativo, em quatro diferentes meios de cultivo: MEA (extrato de malte e Ágar - OXOID), WA (água de cocção do trigo e ágar, sem glicose), OA (água de cocção de aveia e ágar) e PDA (infusão de batata, glicose e ágar - OXOID). Para as quatro linhagens de *Pleurotus* avaliadas, o meio WA, bastante semelhante ao meio TD utilizado neste experimento, exceto pela ausência de glicose, proporcionou o menor tempo de produção de inóculo viável.

A Figura 3.2 apresenta a produção de biomassa (X) e o consumo de glicose (S) em função do tempo de cultivo, quando o meio TD foi utilizado. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo B – Tabela B3.

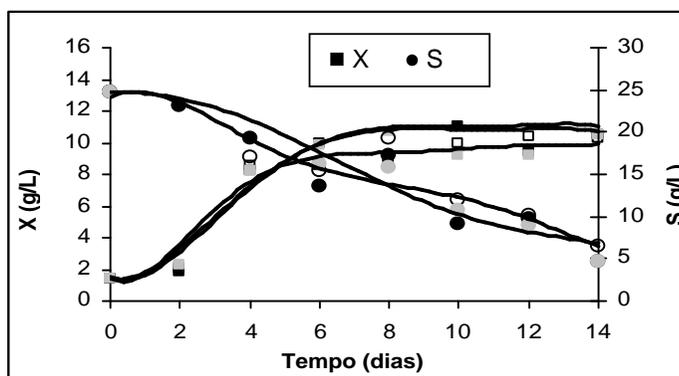


Figura 3.2 Variação das concentrações de substrato (S) e de biomassa (X) de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio TD, para as triplicatas avaliadas.

Outro fato interessante é que esse fungo chega à concentração de biomassa de $8,76 \text{ g.L}^{-1}$ em meio TD consumindo somente cerca de 31% da glicose inicial. Isso se deve, provavelmente ao fato de o meio TD ser composto por extrato de trigo e conter

outros açúcares, embora em baixa concentração (9,8% de ART), mas talvez mais favoráveis ao crescimento de *Pleurotus ostreatus*. O baixo consumo de substrato também pode significar uma possível limitação do crescimento pela baixa concentração de proteínas no meio TD ($0,63 \text{ g.L}^{-1}$). No entanto, foi observado em ensaios preliminares (não apresentados) que a ausência de glicose no meio TD inibe o crescimento de *Pleurotus ostreatus*. Sendo assim, os resultados sugerem que a concentração inicial de glicose a ser utilizada no meio TD deve ser avaliada em novos experimentos.

A Figura 3.3 apresenta a produção de biomassa (X) e o consumo de glicose (S), em função do tempo de cultivo, utilizando-se o meio POL-MIL. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo B – Tabela B2.

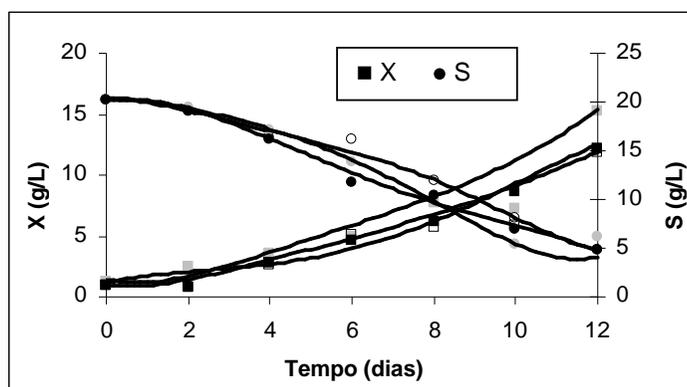


Figura 3.3 Variação das concentrações de substrato (S) e de biomassa (X) de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, em função do tempo de cultivo, em meio POL-MIL, para as triplicatas avaliadas

Utilizando o meio POL-MIL, em 12 dias de cultivo, quando o experimento foi interrompido, a concentração de biomassa (X) foi de $15,27 \text{ g.L}^{-1}$, representando uma produtividade global $1,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Para efeito de comparação entre os experimentos, esta produtividade foi considerada máxima.

Os fatores de conversão de glicose em biomassa ($Y_{X/S}$) foram de 0,40; 0,63 e 0,88 g.g^{-1} para os meios POL, TD e MIL, respectivamente.

A Figura 3.4 apresenta a produtividade máxima em biomassa e o fator de conversão de substrato em biomassa para cada meio testado. Testes estatísticos de Análise de Variância (VIEIRA, 1980), realizados no nível de significância de 0,05, demonstraram que as diferenças encontradas para os valores de produtividade e o fator de conversão de substrato em biomassa são significativas (Anexo F).

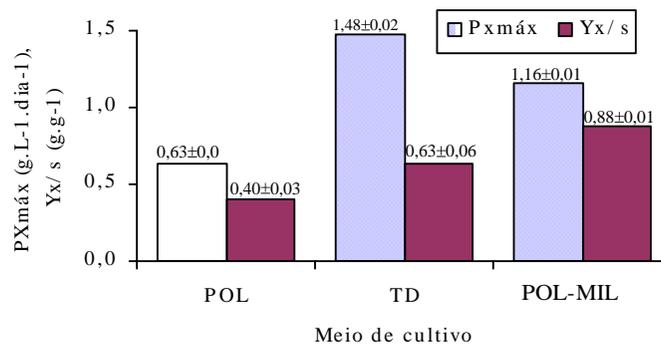


Figura 3.4 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) e fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) de *Pleurotus ostreatus* obtida com os meios POL, TD e MIL.

Verificou-se ainda que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{Xmáx}$) alcançada pelo microrganismo no meio TD foi de 0,71 dia⁻¹, valor este 61,4 e 86,8% superior aos valores alcançados em meio POL (0,44 dia⁻¹) e MIL (0,38 dia⁻¹), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados para o meio POL e POL-MIL.

Embora a concentração máxima de biomassa de *P. ostreatus* e o fator de conversão de substrato em biomassa alcançados utilizando o meio de cultivo POL-MIL tenham sido, respectivamente 44,2% e 39,2,0% superiores às obtidas com o meio TD, comparando-se as produtividades máximas, a significativa diminuição de sete dias no tempo de processo e a possibilidade de utilização de um resíduo da própria produção de cogumelos, optou-se por definir o meio TD para dar continuidade aos estudos de otimização de produção de biomassa e polissacarídeos. A glicose residual presente no

final do processo quando o meio TD foi utilizado, sugere novos experimentos avaliando a concentração de glicose inicial a ser utilizada neste meio.

3.2 Suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose

Uma vez definido o meio TD (20 g de glicose em 1 L de extrato de trigo) para produção de biomassa em cultivo submerso, neste experimento, foram avaliadas outras concentrações iniciais de glicose no extrato de trigo (descrito no item 2.2.1), quanto à produtividade máxima em biomassa, ao fator de conversão de substrato em biomassa e à velocidade específica máxima de crescimento.

A Figura 3.5 mostra a concentração de biomassa de *Pleurotus ostreatus* e o consumo de substrato, obtidos com extrato de trigo suplementado com 5 g.L⁻¹ de glicose. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo C – Tabela C1.

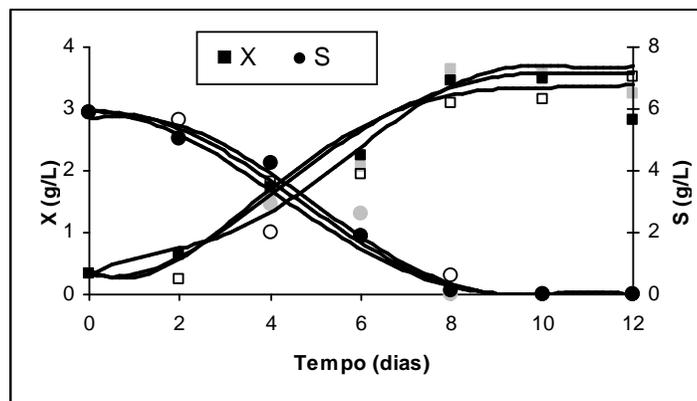


Figura 3.5 Cinética de crescimento celular (X) e consumo de substrato (S) de *Pleurotus ostreatus* em extrato de trigo contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, das triplicatas avaliadas.

A Figura 3.6 mostra a concentração de biomassa de *Pleurotus ostreatus* e o consumo de substrato, obtidos em extrato de trigo contendo 10 g.L⁻¹ de glicose. Os dados

experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo C – Tabela C2.

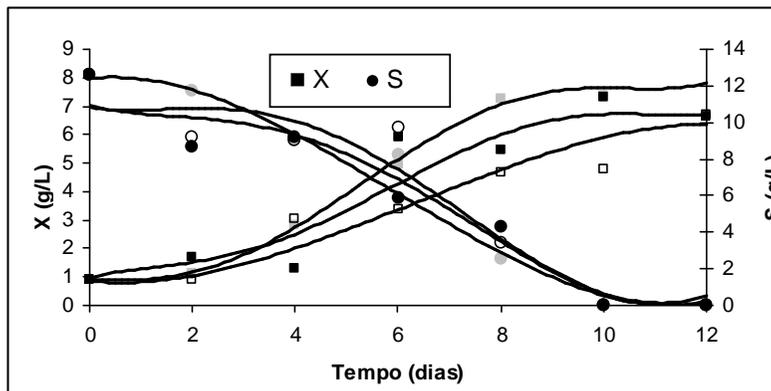


Figura 3.6 Cinética de crescimento celular e consumo de substrato de *Pleurotus ostreatus* em extrato de trigo contendo 10 g.L^{-1} de glicose, para as triplicatas avaliadas.

A Figura 3.7 mostra a concentração de biomassa de *Pleurotus ostreatus* e o consumo de substrato, obtidos em extrato de trigo contendo 15 g.L^{-1} de glicose. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo C – Tabela C3.

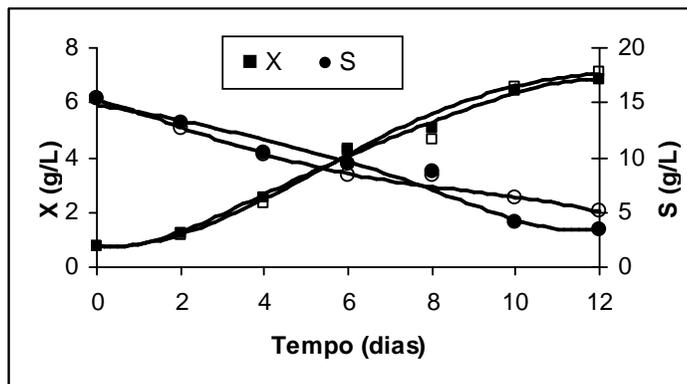


Figura 3.7 Cinética de crescimento celular e consumo de substrato de *Pleurotus ostreatus* em extrato de trigo contendo 15 g.L^{-1} de glicose, para as duplicatas avaliadas.

A Figura 3.8 apresenta a concentração de biomassa e o consumo de glicose utilizando-se o extrato de trigo contendo 20 g.L^{-1} de glicose (meio TD). Os dados

experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no Anexo C – Tabela C4.

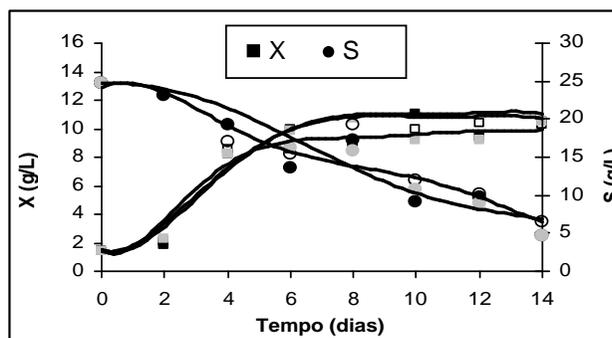


Figura 3.8 Cinética de crescimento celular e consumo de substrato de *Pleurotus ostreatus* em extrato de trigo contendo 20 g.L⁻¹ de glicose, para as triplicatas avaliadas.

A Figura 3.9 apresenta a média das produtividades máximas em biomassa e do fator de conversão de substrato em biomassa para cada concentração de glicose testada. De acordo com as análises estatísticas realizadas, só não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de produtividade obtidos com 10 e 15 g.L⁻¹ de glicose. Quanto ao fator de conversão de substrato em biomassa, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos com todas as concentrações de glicose avaliadas.

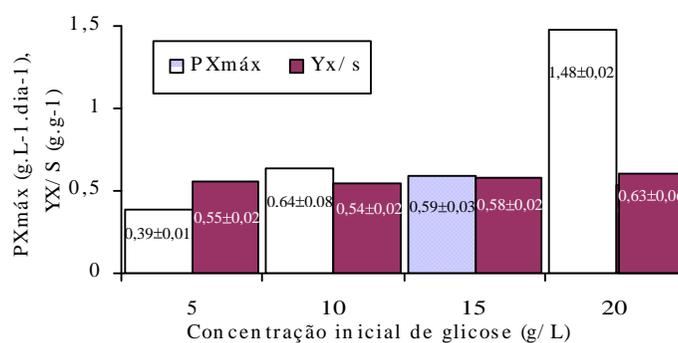


Figura 3.9 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) e fator de conversão de substrato em biomassa de *Pleurotus ostreatus* ($Y_{X/S}$) obtidas com diferentes concentrações iniciais de glicose em extrato de trigo.

Os melhores resultados em termos de produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{máx}}=1,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foram encontrados quando o extrato de trigo foi suplementado com 20 g.L^{-1} de glicose.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores que reportam melhores resultados quando concentrações de glicose iguais ou acima de 20 g.L^{-1} são utilizadas (BURNS *et al.*, 1994; WISBECK *et al.*, 2002). Burns *et al.* (1994) quando utilizaram 20 g.L^{-1} de glicose para o cultivo de *Pleurotus* sp. var. *florida*, alcançaram uma concentração celular de $11,5 \text{ g.L}^{-1}$ em 15 dias de cultivo.

A Tabela 3.1 apresenta o resumo dos resultados obtidos nos experimentos com diferentes meios de cultivo e diferentes concentrações da fonte de carbono.

Tabela 3.1 Máxima concentração de biomassa ($X_{máx}$), concentração de substrato no ponto onde X é máximo ($S_{X_{máx}}$), produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{máx}}$), produtividade total em biomassa (P_X), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{máx}}$) obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e da fonte de carbono.

EXP	$X_{máx}^*$ (g.L^{-1})	$S_{X_{máx}}^*$ (g.L^{-1})	$P_{X_{máx}}^*$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	P_X^* ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	$Y_{X/S}^*$ (g.g^{-1})	$\mu_{X_{máx}}^*$ (dia^{-1})
ET5	3,56±0,09	0	0,39±0,01	0,30±0,03	0,55±0,02	0,59±0,14
ET10	6,91±0,19	0,30±0,16	0,64±0,08	0,57±0,06	0,54±0,02	0,36±0,05
ET15	7,27±0,12	4,39±0,86	0,59±0,03	0,52±0,01	0,58±0,02	0,43±0,03
ET20 (TD)	10,58±0,38	9,96±1,00	1,48±0,02	0,92±0,13	0,63±0,06	0,71±0,06
POL	7,29±0,58	4,60±1,97	0,63±0,01	0,60±0,02	0,40±0,03	0,44±0,01
POL-MIL	15,27±0,21	4,60±0,24	1,16±0,01	1,16±0,01	0,88±0,01	0,38±0,07

*média dos valores obtidos das curvas traçadas em triplicata

ET - Extrato de trigo

O baixo fator de conversão de substrato em biomassa utilizando extrato de trigo contendo 20 g.L^{-1} de glicose (meio TD - $0,63 \text{ g.g}^{-1}$), quando comparado ao fator de conversão de substrato em biomassa alcançado com o meio POL-MIL ($0,88 \text{ g.g}^{-1}$), sugerem uma limitação do crescimento, possivelmente causada pelo esgotamento da fonte de nitrogênio. Novos experimentos visando a suplementação do extrato de trigo com fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio foram então realizados.

3.3 Definição da melhor composição do meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos

Neste experimento, dezessete diferentes composições do meio de cultivo para *P. ostreatus* DSM 1833 gerados no planejamento experimental (Tabela 2.2), utilizando como base o extrato de trigo, foram avaliadas quanto à produtividade máxima em biomassa, ao fator de conversão de substrato em biomassa, à concentração máxima de biomassa e à produtividade em polissacarídeos. As Figuras 3.10, 3.11 e 3.12 apresentam a cinética de produção de biomassa e o consumo de substrato de *P. ostreatus* DSM 1833 dos experimentos 1 a 6, 7 a 11 e 12 a 17, respectivamente. Os dados experimentais e os ajustes destes dados aos seus polinômios correspondentes encontram-se no anexo D.

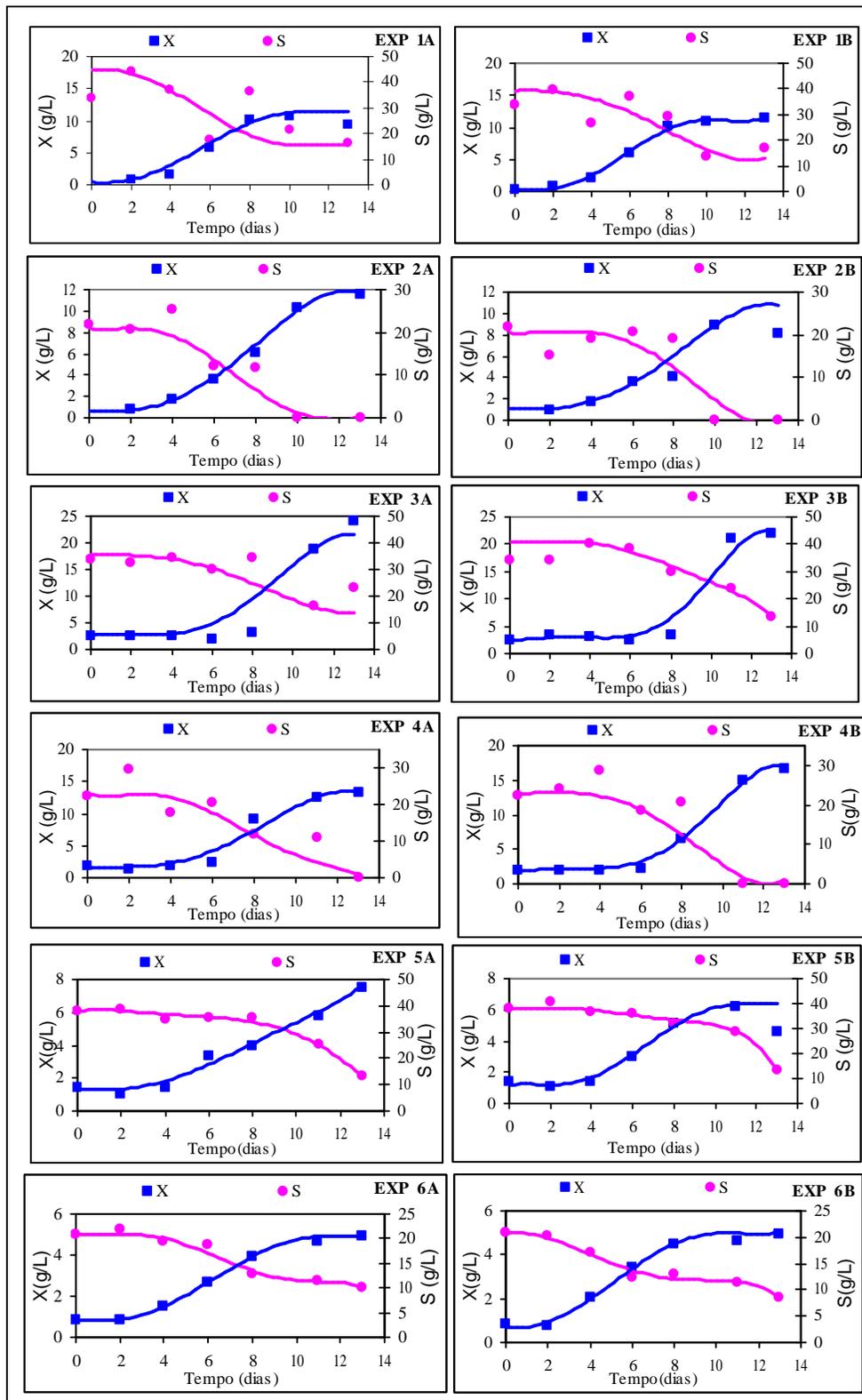


Figura 3.10 Cinética de produção de biomassa de *P. ostreatus* (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 1 a 6.

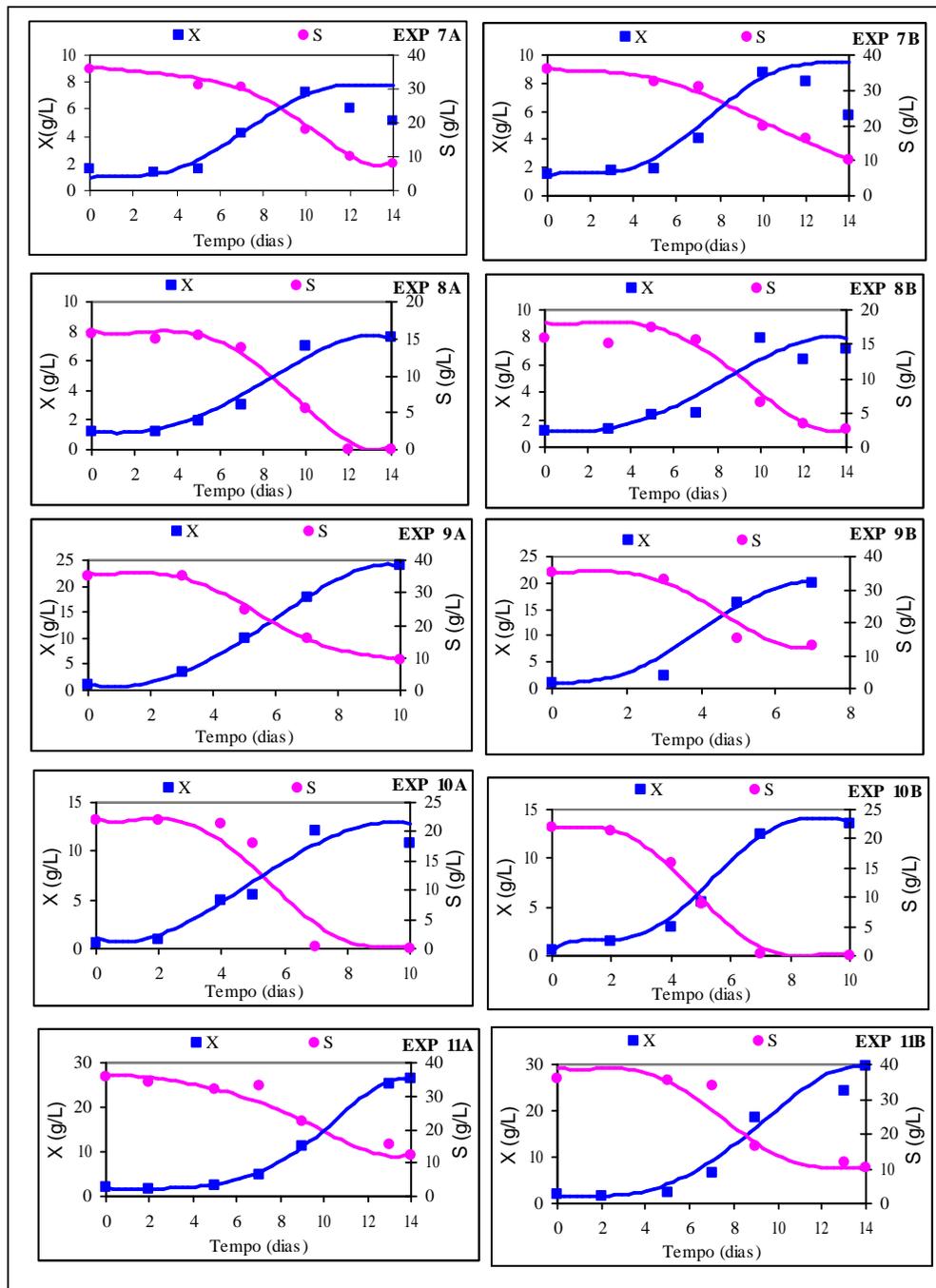


Figura 3.11 Cinética de produção de biomassa de *P. ostreatus* (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 7 a 11.

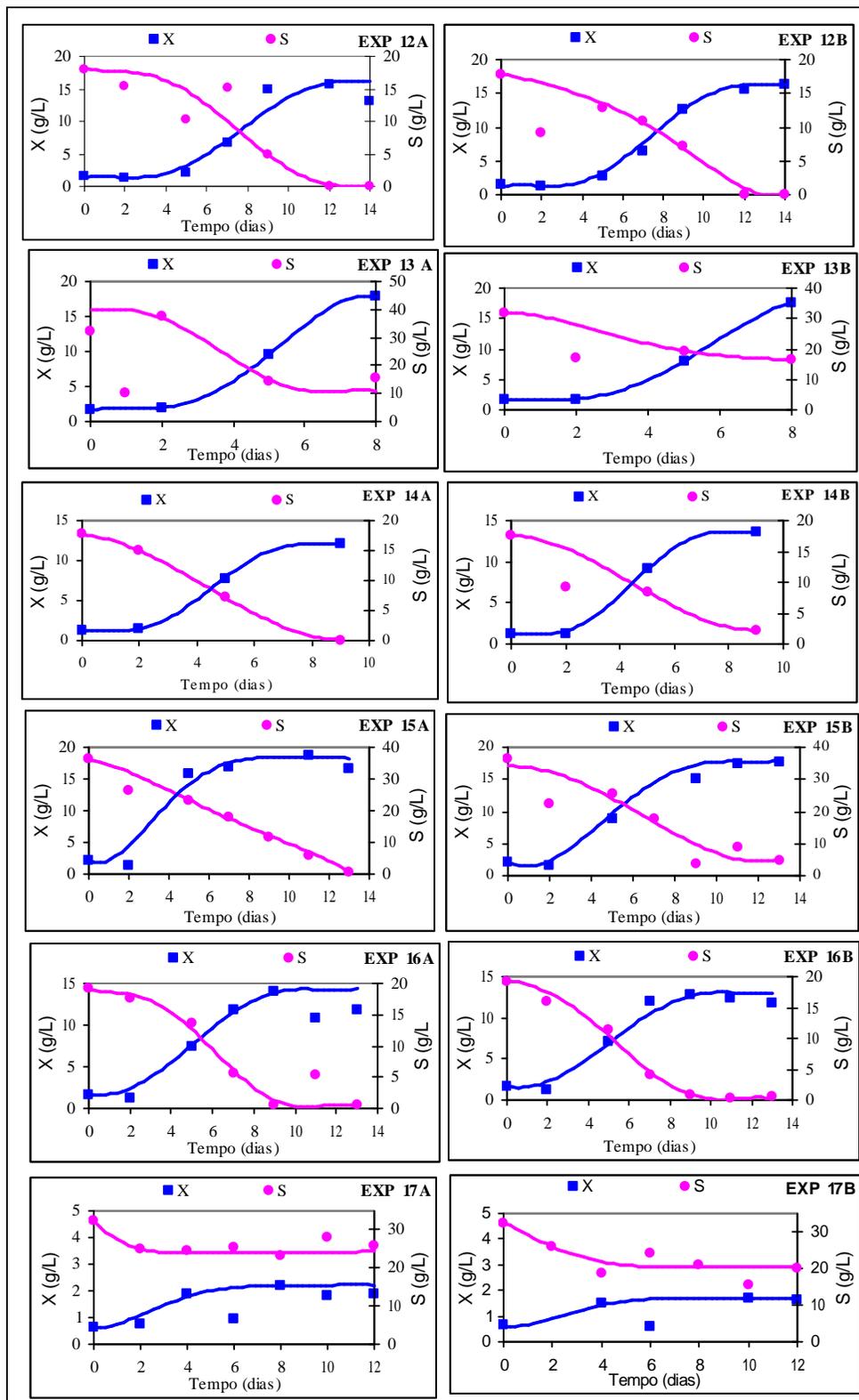


Figura 3.12 Cinética de produção de biomassa de *P. ostreatus* (X) e consumo de substrato (S) para os experimentos 12 a 17.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos nos experimentos 1 a 17.

Tabela 3.2 Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade máxima em biomassa ($P_{Xm\acute{a}x}$), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), velocidade específica máxima de produção de biomassa ($\mu_{Xm\acute{a}x}$), concentração de polissacarídeos (PS), relação entre a biomassa e polissacarídeos (PSX), produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}) e fator de conversão de substrato em polissacarídeos ($Y_{PS/S}$), para os experimentos 1 a 17.

EXP	FO ¹	NO ² (g.L ⁻¹)	NI ³ (g.L ⁻¹)	GLI ⁴ (g.L ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	$P_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$\mu_{Xm\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)	PS (mg.L ⁻¹)	PSX (mg.g ⁻¹)	P_{PS} (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{PS/S}$ (mg.g ⁻¹)
1	YE	5	5	40	11,15±0,14	1,16±0,00	0,41±0,03	0,87±0,08	222,58±12,65	19,46±1,12	17,12±0,97	8,05±0,86
2	YE	5	5	20	10,86±0,51	0,90±0,07	0,51±0,03	0,40±0,07	241,18±18,66	21,51±0,83	18,55±1,44	11,73±0,72
3	MIL	20	5	40	22,45±0,37	1,57±0,03	0,84±0,05	0,38±0,03	103,40±1,08	4,72±0,00	7,95±0,08	4,30±0,45
4	MIL	20	5	20	17,12±1,82	1,16±0,11	0,62±0,04	0,34±0,02	160,13±19,18	10,57±0,00	12,32±1,48	7,00±0,86
5	YE	2	5	40	6,38±0,62	0,50*±0,00	0,32±0,07	0,27±0,05	45,36±9,64	6,41±0,80	3,49±0,74	1,79±0,41
6	YE	2	5	20	4,99±0,02	0,44±0,04	0,44±0,03	0,35±0,03	132,06±5,57	26,25±1,55	10,16±0,43	11,47±1,24
7	MIL	10	5	40	9,45±0,81	0,66±0,04	0,29±0,04	0,33±0,02	69,58±7,82	8,06±0,07	4,97±0,56	2,61±0,39
8	MIL	10	5	20	8,05±0,16	0,54±0,00	0,41±0,01	0,26±0,00	7,44±2,03	0,96±0,24	0,53±0,15	0,47±0,14
9	YE	5	0	40	20,49±1,83	2,78±0,23	0,87±0,00	0,85±0,00	160,38±0,56	7,25±0,55	20,05±3,37	6,59±0,58
10	YE	5	0	20	14,15±0,58	1,55±0,15	0,57±0,04	0,69±0,10	199,96±34,06	14,84±1,96	19,99±3,41	9,05±1,60
11	MIL	20	0	40	29,64±1,54	2,00±0,14	0,99±0,02	0,41±0,03	238,15±58,12	8,44±1,61	17,01±4,15	8,89±1,40
12	MIL	20	0	20	16,33±0,07	1,30±0,04	0,83±0,01	0,50±0,03	158,21±14,13	9,80±0,93	11,30±1,01	8,78±0,71
13	YE	2	0	40	17,60±0,17	2,09±0,10	0,79±0,22	0,58±0,02	87,96±23,48	4,98±1,35	11,00±2,93	4,67±2,43
14	YE	2	0	20	13,63±0,80	1,65±0,11	0,74±0,09	0,68±0,02	103,32±8,849	7,93±0,19	11,48±0,94	6,30±0,94
15	MIL	10	0	40	17,80±0,37	2,07±0,30	0,54±0,01	0,70±0,06	127,92±11,19	7,06±0,55	9,84±0,86	3,95±0,08
16	MIL	10	0	20	13,09±0,61	1,34±0,06	0,63±0,04	0,44±0,01	168,93±67,25	12,14±4,33	12,99±5,17	8,89±3,60
17	-	0	2,5	30	1,69±0,27	0,25±0,04	0,14±0,05	0,34±0,03	19,31±2,78	9,95±0,00	1,61±0,23	2,12±0,73

*valores obtidos no tempo final de cultivo, uma vez que quando o processo foi interrompido, o patamar onde $dX/dt=0$ ainda não havia sido alcançado.

¹FO – Fonte orgânica de nitrogênio

²NO - Concentração da fonte orgânica de nitrogênio

³NI – Concentração da fonte inorgânica de nitrogênio

⁴GLI – Concentração inicial de glicose

A Figura 3.13 apresenta a produtividade máxima em biomassa e a produtividade total em polissacarídeos, para os experimentos 1 a 17.

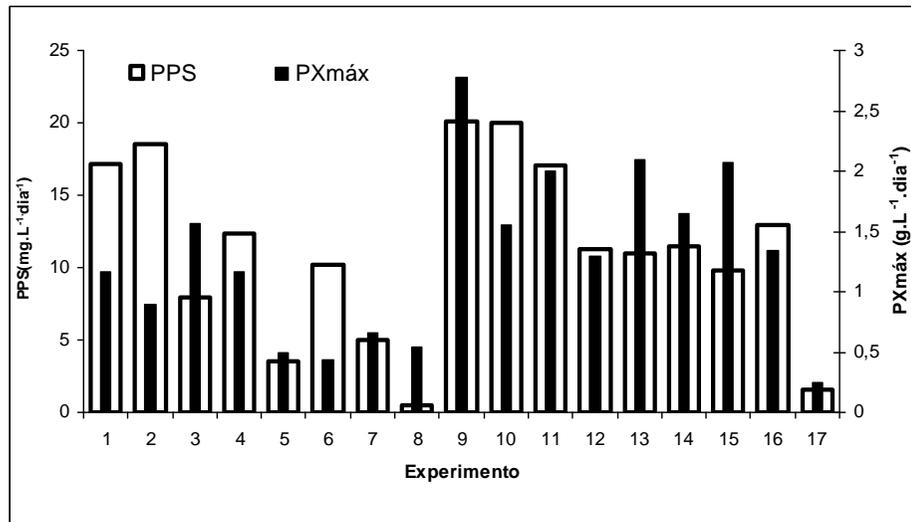


Figura 3.13 Produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) e produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}) para os experimentos 1 a 17.

A Tabela 3.3 apresenta os efeitos dos fatores avaliados no planejamento fatorial 2^4 sobre a concentração máxima de biomassa, sobre a produtividade máxima em biomassa, sobre o fator de conversão de substrato em biomassa, sobre a velocidade específica máxima de crescimento, sobre a produtividade global em polissacarídeos e sobre a concentração de polissacarídeos.

Tabela 3.3 Efeitos dos fatores avaliados sobre a concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), sobre a produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{m\acute{a}x}}$), sobre o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{m\acute{a}x}}$), sobre a concentração de polissacarídeos (PS), sobre a relação entre a biomassa e polissacarídeos (PSX), sobre a produtividade global em polissacarídeos (P_{PS}) e sobre o fator de conversão de substrato em polissacarídeos ($Y_{PS/S}$).

	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	$P_{X_{m\acute{a}x}}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$\mu_{X_{m\acute{a}x}}$ (dia ⁻¹)	PS (mg.L ⁻¹)	PSX (mg.g ⁻¹)	P_{PS} (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{PS/S}$ (mg.g ⁻¹)
1 FO	-3,62±1,45*	0,06±0,14	-0,06±0,06	0,17±0,03*	22,35±19,89	5,86±1,31*	4,29±1,68*	1,85±0,93
2 NO (g.L ⁻¹)	6,16±1,45*	0,39±0,14*	0,19±0,06*	0,10±0,03*	90,30±19,89*	2,85±1,31*	7,40±1,68*	3,03±0,93*
3 NI (g.L ⁻¹)	-6,78±1,45*	-0,99±0,14*	-0,26±0,06*	-0,21±0,03*	-35,55±19,89	3,18±1,31*	-4,75±1,68*	-1,21±0,93
4 GLI (g.L ⁻¹)	4,94±1,45*	0,50±0,14*	0,04±0,06	0,09±0,03*	-12,07±19,89	-4,70±1,31*	-0,81±1,68	-2,86±0,93*
1 e 2	-2,17±1,45	0,04±0,14	-0,17±0,06*	0,13±0,03*	23,85±19,89	1,53±1,31	2,35±1,68	-0,23±0,93
1 e 3	-1,19±1,45	-0,28±0,14	-0,06±0,06	-0,02±0,03	57,65±19,89*	6,47±1,31*	1,59±1,68	2,82±0,93*
1 e 4	-1,02±1,45	-0,003±0,14	-0,004±0,06	0,02±0,03	-27,70±19,89	-3,41±1,31*	-1,47±1,68	-1,51±0,93
2 e 3	1,72±1,45	0,27±0,14	0,04±0,06	0,09±0,03*	23,05±19,89	0,80±1,31	1,79±1,68	0,65±0,93
2 e 4	1,89±1,45	0,16±0,14	0,11±0,06	0,06±0,03	7,94±19,89	0,49±1,31	0,66±1,68	0,67±0,93
3 e 4	-2,57±1,45	-0,28±0,14	-0,07±0,06	0,03±0,03	-8,17±19,89	-0,46±1,31	-1,20±1,68	-0,63±0,93
1, 2 e 3	-0,37±1,45	-0,13±0,14	0,02±0,06	0,00±0,03	6,40±19,89	-1,01±1,31	-0,53±1,68	-0,19±0,93
1, 2 e 4	-1,46±1,45	0,09±0,14	-0,04±0,06	0,15±0,03*	2,90±19,89	2,80±1,31*	0,64±1,68	0,62±0,93
1, 3 e 4	-0,37±1,45	-0,06±0,14	-0,07±0,06	0,05±0,03	-4,28±19,89	-2,38±1,31	-0,57±1,68	-1,69±0,93
2, 3 e 4	-0,91±1,45	-0,03±0,14	-0,02±0,06	0,08±0,03*	-16,31±19,89	0,72±1,31	-1,55±1,68	-0,38±0,93
VAES**	3,03	0,29	0,13	0,06	41,57	2,74	3,51	1,94

*Efeitos estatisticamente significativos (95% de nível de confiança)

**Valor Absoluto Estatisticamente Significativo

1. FO – Fonte orgânica de nitrogênio

2. NO – Concentração da fonte orgânica de nitrogênio

3. NI – Concentração da fonte inorgânica de nitrogênio

4. GLI – Concentração inicial de glicose

Os efeitos apresentados na Tabela 3.3 são considerados estatisticamente significativos somente quando seus valores em módulo forem superiores ao Valor Absoluto Estatisticamente Significativo (VAES) correspondente.

Um efeito negativo expressa que o valor da variável aumenta na direção do nível inferior do planejamento e um efeito positivo expressa que o valor da variável aumenta na direção do nível superior.

A Figura 3.14 apresenta o gráfico em cubo com as médias previstas para a variável $P_{X_{m\acute{a}x}}$ como resultado da interação entre os fatores nível da concentração da fonte de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e concentração inicial de glicose.

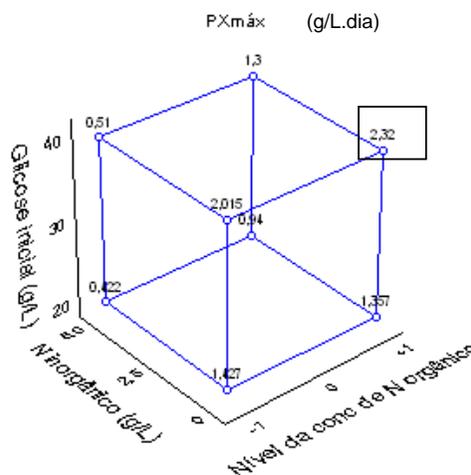


Figura 3.14 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável $P_{X_{m\acute{a}x}}$ em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e concentração inicial de glicose.

De acordo com a Figura 3.14, os melhores resultados em termos de $P_{X_{m\acute{a}x}}$ são obtidos quando as concentrações de glicose e de nitrogênio orgânico estão no nível superior e a concentração de nitrogênio inorgânico está no nível inferior. Os mesmos resultados são mostrados pelo gráfico de superfície (Figura 3.15) que apresenta a interação entre os fatores concentração de glicose e de nitrogênio inorgânico, mantendo a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico no nível superior.

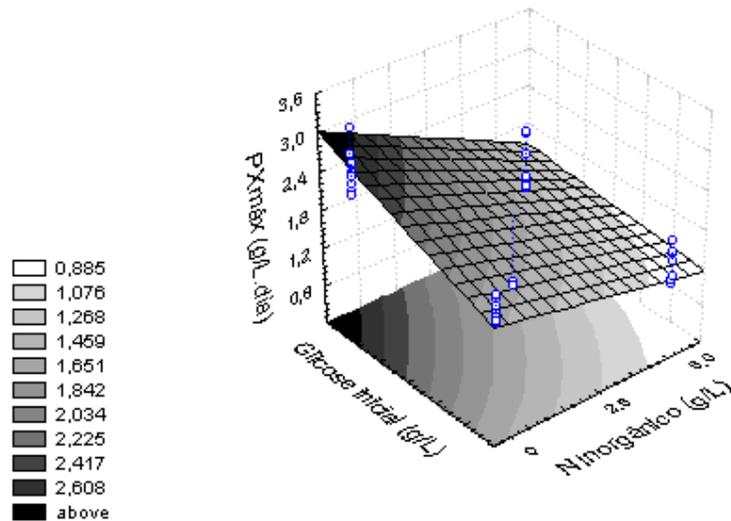


Figura 3.15 Efeito da concentração inicial de glicose e da concentração da fonte de nitrogênio inorgânico sobre a produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{máx}}$), quando a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico estão no nível superior.

A Figura 3.16 apresenta os gráficos em cubo, com as médias de produtividade em polissacarídeos previstas para as interações entre a fonte de nitrogênio orgânico e as concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico.

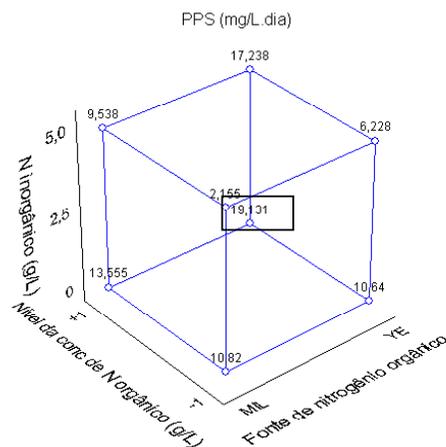


Figura 3.16 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável P_{PS} em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e fonte de nitrogênio orgânico.

A Figura 3.17 apresenta o gráfico de superfície com as interações entre a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico para a variável P_{PS} , quando as concentrações de nitrogênio inorgânico e de glicose encontram-se no nível inferior.

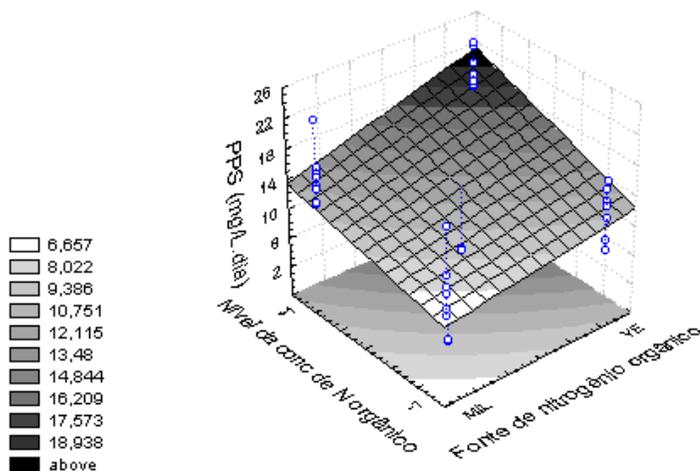


Figura 3.17 Efeito da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e da fonte de nitrogênio orgânico sobre a produtividade total em polissacarídeos (P_{PS}), quando as concentrações de nitrogênio inorgânico e de glicose encontram-se no nível inferior.

De acordo com as Figuras 3.16 e 3.17, os melhores resultados em termos de produtividade em polissacarídeos (P_{PS}) são obtidos quando a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico estão no nível superior e a concentração de nitrogênio inorgânico, no nível inferior. A concentração de glicose não possui efeito significativo sobre esta variável.

As Figuras 3.18 e 3.19 apresentam os gráficos em cubo com as médias previstas para a relação entre a concentração de polissacarídeos e a concentração de biomassa (PSX), quando da interação entre a fonte de nitrogênio orgânico e as concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico e quando da interação entre a fonte de nitrogênio orgânico e as concentrações de nitrogênio orgânico e glicose, respectivamente. Melhores resultados são obtidos quando a fonte e a concentração de nitrogênio orgânico e a concentração de nitrogênio inorgânico são mantidas no nível superior e a concentração

de glicose é mantida no nível inferior. As Figuras 3.20 e 3.21 mostram os mesmos resultados, apresentados em gráfico de superfície.

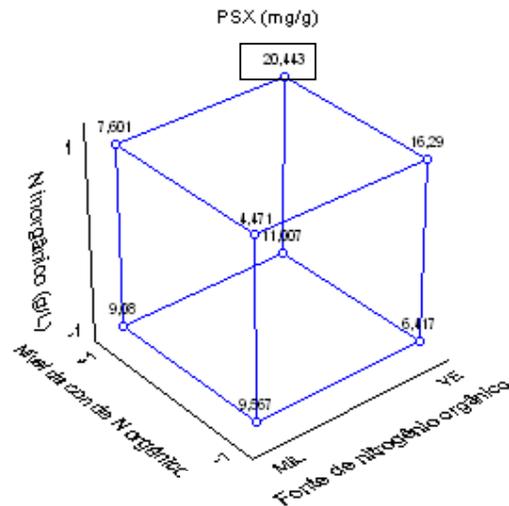


Figura 3.18 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável PSX em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração de nitrogênio inorgânico e fonte de nitrogênio orgânico.

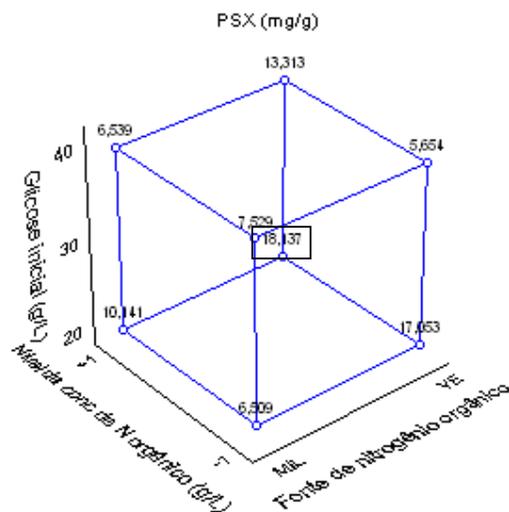


Figura 3.19 Gráfico em cubo das médias previstas para a variável PSX em resposta a interação dos fatores concentração de nitrogênio orgânico, concentração inicial de glicose e fonte de nitrogênio orgânico.

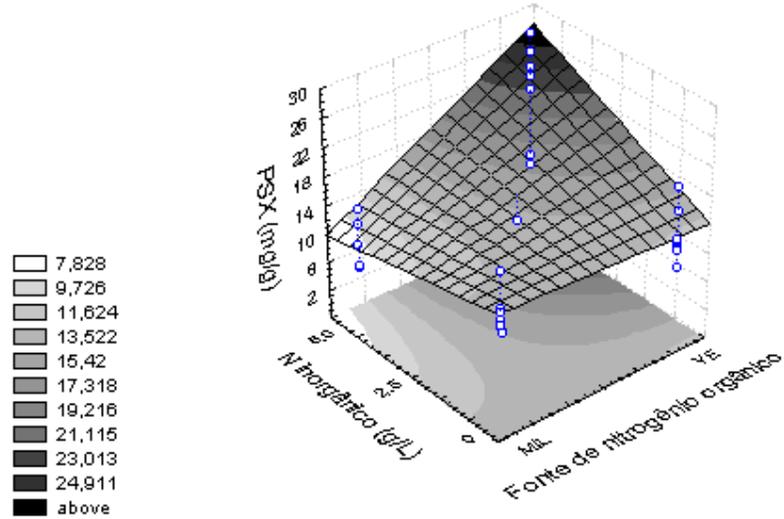


Figura 3.20 Efeito da fonte de nitrogênio orgânico e da concentração de nitrogênio inorgânico sobre a relação entre a concentração de biomassa e a concentração de polissacarídeos (PSX), quando a concentração inicial de glicose e a concentração de nitrogênio orgânico estão no nível inferior e superior, respectivamente.

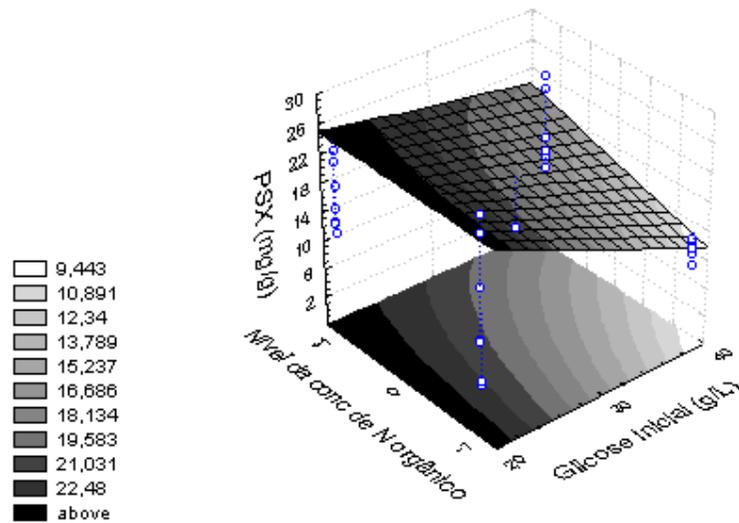


Figura 3.21 Efeito da concentração de nitrogênio orgânico e da concentração inicial de glicose sobre a relação entre a concentração de biomassa e a concentração de polissacarídeos (PSX), quando a fonte de nitrogênio orgânico e a concentração de nitrogênio inorgânico estão no nível superior.

Os efeitos não significativos não foram apresentados.

Observando os valores dos efeitos individuais apresentados na Tabela 3.3 e nas Figuras 3.14 a 3.21 pode-se concluir:

O tipo da fonte de nitrogênio orgânico (água de maceração de milho – MIL ou extrato de levedura - YE) possui efeito significativo sobre a concentração máxima de biomassa. Neste caso, a substituição do extrato de levedura por água de maceração do milho proporciona melhores resultados para esta variável. O fato desta substituição não afetar significativamente a produtividade máxima em biomassa ($P_{X_{máx}}$) pode ser explicado pela fase *lag* mais longa apresentada quando *P. ostreatus* é cultivado no meio contendo MIL, provavelmente pela necessidade de adaptação ao novo meio, uma vez que o inóculo foi preparado em meio contendo apenas extrato de trigo e glicose. Quanto ao fator de conversão de substrato em biomassa, embora a concentração máxima de biomassa tenha sido superior quando milhocina foi utilizada, em presença de sulfato de amônio, o consumo de substrato aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de biomassa. Outro fator a ser considerado quando a fonte de nitrogênio orgânica é avaliada, é o pH inicial do meio de cultivo (Tabela 3.4). Os meios que continham milhocina na sua composição apresentaram um pH inicial cerca de 25% inferior ao dos meios de cultivo contendo extrato de levedura. Este fato pode também ter sido responsável pelos melhores resultados encontrados quando milhocina foi utilizada. No entanto, não parece haver relação entre o pH final do meio de cultivo e a produção de biomassa. Em oposição aos resultados obtidos para $X_{máx}$, a velocidade específica máxima de crescimento, a relação entre a produção de polissacarídeos e a concentração de biomassa e a produtividade global em polissacarídeos são afetadas negativamente pelo uso de água de maceração de milho. Neste caso, o uso de extrato de levedura proporciona resultados superiores àqueles encontrados quando a água de maceração do milho é utilizada. A concentração de polissacarídeos intracelulares e o fator de conversão de substrato em polissacarídeos não são afetados significativamente pela fonte de nitrogênio orgânico.

Tabela 3.4 pH inicial e final dos diferentes meios de cultivo.

EXP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH inicial	5,76	5,98	4,51	4,53	6,01	6,26	4,59	4,64	5,91
pH final	3,14	3,66	3,65	3,76	3,78	3,78	3,34	3,24	4,85
EXP	10	11	12	13	14	15	16	17	
pH inicial	5,97	4,21	4,23	5,84	6,01	4,57	4,52	6,22	
pH final	7,63	4,85	6,49	6,08	6,47	6,23	8,09	2,92	

Quanto à concentração de nitrogênio orgânico, um aumento no valor desta variável tem um efeito positivo significativo sobre todas as variáveis relacionadas à biomassa, embora este efeito seja muito mais acentuado sobre a concentração máxima de biomassa. A concentração de nitrogênio orgânico no nível superior também favorece o aumento da concentração e da produtividade em polissacarídeos e o fator de conversão de substrato em polissacarídeos.

A adição de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio) leva, em geral, a um decréscimo dos parâmetros relacionados à biomassa avaliados. Os baixos valores encontrados para $X_{máx}$, $P_{Xmáx}$, $Y_{X/S}$ e $\mu_{Xmáx}$ (1,95 g.L⁻¹; 0,25 g.L⁻¹.dia⁻¹, 0,15 g.g⁻¹ e 0,34 dia⁻¹, respectivamente) quando o sulfato de amônio foi utilizado na ausência de uma fonte de nitrogênio orgânico (ponto central do planejamento fatorial) sugerem a não utilização desta fonte inorgânica de nitrogênio por *P. ostreatus*. Além disso, quando compara-se estes resultados com os obtidos no experimento contendo apenas extrato de trigo e glicose (meio TD - item 3.1), observa-se que a concentração máxima de biomassa alcançada neste experimento é aproximadamente 16 vezes superior a alcançada quando o sulfato de amônio é utilizado, mostrando uma clara inibição do crescimento deste fungo por este composto. A produtividade em polissacarídeos também é diminuída quando o sulfato de amônio é utilizado no meio de cultivo. Melhores resultados em termos de produtividade em polissacarídeos são alcançados na ausência de sulfato de amônio, no entanto, a relação entre a concentração de polissacarídeos e a biomassa é afetada positivamente pela presença deste sal.

O aumento da concentração de glicose de 20 para 40 g.L⁻¹ possui efeito significativo sobre a concentração de biomassa, sobre a produtividade máxima em

biomassa e sobre a velocidade específica máxima de crescimento. No entanto, nesta condição, apenas cerca de 67% da glicose inicial foi consumida (com exceção do experimento 15), mesmo quando a concentração da fonte de nitrogênio orgânica foi aumentada. Este fato indica que a limitação do consumo de glicose está associada a outro fator, que não a concentração de nitrogênio. Presume-se que o aumento da concentração final de biomassa proporcionado pelo aumento da concentração inicial de glicose e o aumento da viscosidade do meio de cultivo devido à liberação de exopolissacarídeos dificultem a transferência de massa, principalmente oxigênio e glicose, para as células, que passam por uma fase de limitação de nutrientes. BURNS e colaboradores (1994) também observaram que após 20 dias de cultivo de *P. ostreatus* var *florida*, embora ainda houvesse glicose no meio, a produção de exopolissacarídeo e biomassa estavam limitados, provavelmente porque uma camada de polímero circundava a célula, dificultando a transferência de oxigênio. Ao contrário do que acontece com a biomassa, uma maior concentração de glicose apresenta um efeito negativo sobre a relação entre a concentração de polissacarídeos e a concentração de biomassa e sobre o fator de conversão de substrato em polissacarídeos. Com base no relato de autores (ROSADO *et al.*, 2002; WISBECK, 2003) que afirmam que uma elevada concentração de glicose favorece a produção de exopolissacarídeos, pode-se sugerir que neste caso, as glicano-sintases produzidas pelo fungo foram dirigidas para a síntese de polissacarídeos extracelulares e não para a síntese de polissacarídeos da parede celular.

Avaliando os dados apresentados na Tabela 3.3 pode-se ainda observar efeitos significativos de interação entre os fatores avaliados, como o que ocorre entre a fonte de nitrogênio e a sua concentração. Neste caso, a substituição de extrato de levedura por milhocina proporciona, de um modo geral, melhores resultados para $Y_{X/S}$ e $\mu_{Xmáx}$, mas este efeito é muito mais acentuado quando a concentração da fonte de nitrogênio orgânico está no seu nível superior. A velocidade específica máxima de crescimento também é afetada pela interação entre as concentrações de nitrogênio orgânico, inorgânico e de glicose, alcançando melhores resultados quando estes fatores são utilizados conjuntamente nos níveis inferior, inferior e superior, respectivamente.

A interação entre a fonte de nitrogênio orgânico e a concentração de sulfato de amônio também é significativa para a concentração de polissacarídeos e para a relação

entre a concentração de polissacarídeos e a concentração de biomassa, que alcançam melhores resultados quando extrato de levedura é utilizado na presença de sulfato de amônio. Cabe também ressaltar, que quando a fonte de nitrogênio é a milhocina, o sulfato de amônio tem sempre um efeito negativo, levando a supor que a interação entre este sal e algum constituinte da milhocina tenha um efeito inibitório sobre a produção de polissacarídeos.

Burns e colaboradores (1994) avaliaram o efeito do nitrogênio orgânico e inorgânico sobre a produção de biomassa e exopolissacarídeos por *P. sp. florida*. Melhores resultados em termos de biomassa foram alcançados quando maiores concentrações de nitrogênio orgânico foram utilizadas. A substituição do nitrogênio orgânico (asparagina e fenilalanina) por nitrogênio inorgânico (tartarato de amônio) levou a resultados bem inferiores aos encontrados com nitrogênio orgânico. Resultados opostos foram encontrados para a produção de exopolissacarídeos, mostrando que os meios com baixa concentração de nitrogênio foram os mais indicados para a produção de polissacarídeos.

Rosado e colaboradores (2002), avaliando a produção de exopolissacarídeos por *P. ostreorozeus* e *Pleurotus ostreatus* “florida”, variaram a concentração de sulfato de amônio em 5,0 e 2,5 g.L⁻¹. Melhores resultados foram encontrados quando uma concentração de 2,5 g.L⁻¹ foi utilizada.

Wang *et al.* (2005) avaliaram o efeito de diversas fontes de nitrogênio, sobre a produção de biomassa e exopolissacarídeos por *P. citrinopileatus*. Valores 62,5 e 100% inferiores foram encontrados para a concentração de biomassa e a concentração de polissacarídeos, respectivamente, quando sulfato de amônio foi utilizado em substituição a peptona.

A análise dos resultados mostrados na Tabela 3.3 permite concluir que a melhor condição para o aumento da concentração máxima de biomassa e do fator de conversão de substrato em biomassa foi alcançada quando utilizou-se 40 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de água de maceração do milho, na ausência de sulfato de amônio (experimento 11), proporcionando uma concentração de biomassa de 28,1 g.L⁻¹ e um fator de conversão de substrato em célula de 0,99 g.g⁻¹. A melhor condição para o aumento da produtividade máxima em biomassa foi alcançada quando utilizou-se 40 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de

extrato de levedura, na ausência de sulfato de amônio (experimento 9), proporcionando uma produtividade máxima em biomassa de 2,78 g.L⁻¹.dia⁻¹. A melhor velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{Xm\acute{a}x}=0,85$ dia⁻¹) também foi alcançada nesta condição, valor semelhante ao encontrado por Chahal (1989), cultivando *P. sajor-caju*.

Xu *et al.* (2003), cultivando *Paecilomyces tenuipes* também observaram um decréscimo na concentração de biomassa quando fontes de nitrogênio inorgânico (tartarato de amônio e nitrato de potássio) foram utilizadas em substituição à peptona de carne, alcançando uma eficiência de bioconversão de 40% usando um meio de cultivo contendo amido de milho, peptona de carne e extrato de levedura.

Faside *et al.* (1994) avaliaram cinco diferentes fontes de nitrogênio inorgânico no crescimento micelial de *Pleurotus tuber-regium*: NaNO₃, KNO₃, NH₄NO₃, Ca(NO₃)₂ e (NH₄)₂SO₄. Com exceção dos meios contendo Ca(NO₃) e NH₄NO₃, nos quais foram produzidos 60,0 e 50,0 mg/30mL, respectivamente, todas as demais fontes de nitrogênio inorgânico apresentaram concentração de biomassa inferior à encontrada com o meio basal utilizado como controle, que não continha fonte de nitrogênio. Dentre as fontes de nitrogênio orgânico testadas (peptona, uréia, extrato de levedura e caseína), extrato de levedura apresentou os melhores resultados (103 mg/30 mL), sugerindo uma forte preferência deste fungo por compostos nitrogenados orgânicos.

Manu-Tawiah & Martin (1988) avaliaram o efeito da suplementação de nitrogênio orgânico e inorgânico em um meio contendo extrato de turfa. Os autores observaram uma baixa produção de biomassa de *P. ostreatus* quando sulfato de amônio foi utilizado (1,20 g.L⁻¹). No entanto, a melhor produção de biomassa foi alcançada com extrato de levedura (4,98 g.L⁻¹).

Com base na produtividade total, a melhor condição para a produção de polissacarídeos (20,05 mg.L⁻¹.dia⁻¹) é encontrada quando utiliza-se 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 40 g.L⁻¹ de glicose, na ausência de sulfato de amônio (meio 9). Embora os resultados apontem para o uso de extrato de levedura na composição do meio para obtenção de polissacarídeos, o elevado custo do extrato de levedura aliado a pequena diferença encontrada entre as produtividades em polissacarídeos (~18%) obtidas no experimento 11 (17,01 mg.L⁻¹.dia⁻¹), contendo água de maceração de milho em substituição ao extrato de levedura, levou a escolha deste meio como sendo o mais

apropriado para a produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus* em cultivo submerso.

3.4 Avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de K_{La} inicial

Neste experimento, o meio 11, selecionado no item 3.3 foi avaliado em escala ampliada (4L), em dois diferentes valores de K_{La} inicial, $19,3 \text{ h}^{-1}$ (400 rpm e 2 L de ar/min) e $10,2 \text{ h}^{-1}$ (330 rpm e 1 L de ar/min). As Figuras 3.22 e 3.23 mostram as curvas de concentração de biomassa, consumo de substrato e concentração de exopolissacarídeos obtidas. A Tabela 3.5 mostra os parâmetros cinéticos obtidos destas curvas. As curvas de X e S em função do tempo de cultivo de *P. ostreatus* para o K_{La} de $19,3 \text{ h}^{-1}$ foram ajustadas com polinômios de 5ª ordem e para o K_{La} de $10,2 \text{ h}^{-1}$, com polinômios de 3ª e 4ª ordem, respectivamente.

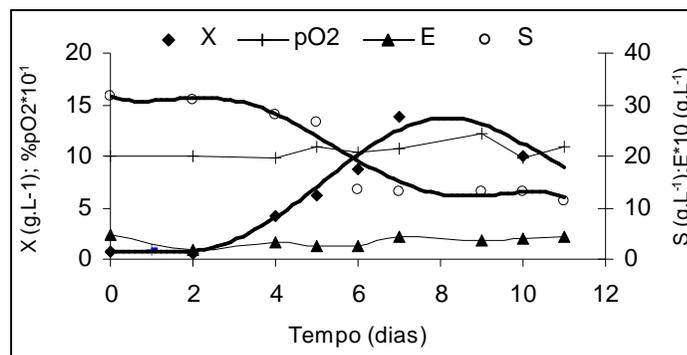


Figura 3.22 Cinética de produção de biomassa (X), de consumo de substrato (S), de pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO2) e de produção de exopolissacarídeos (E) para *P. ostreatus* cultivado em K_{La} inicial de $19,3 \text{ h}^{-1}$.

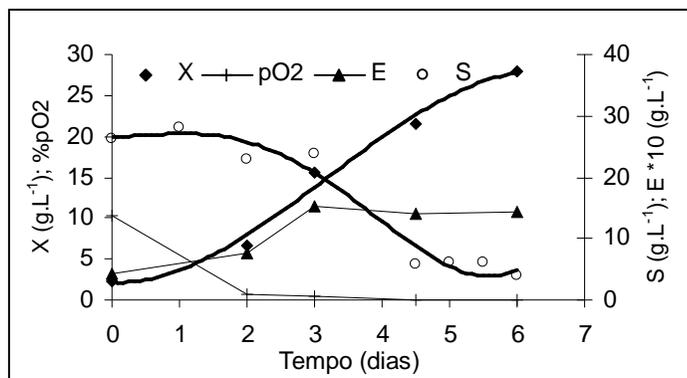


Figura 3.23 Cinética de produção de biomassa (X), de consumo de substrato (S), de pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO₂) e de produção de exopolissacarídeos (E) para *P. ostreatus* cultivado em K_{La} inicial de 10,2 h⁻¹.

Tabela 3.5 Parâmetros cinéticos para *P. ostreatus* cultivado em K_{La} inicial de 19,3 e 10,2 h⁻¹.

	K_{La} (h ⁻¹)	
	19,3	10,2
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	12,45	27,72
$\mu_{Xm\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)	0,92	0,84
$P_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	1,60	4,56
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	0,64	1,18
PSX (mg.g ⁻¹)	7,35	7,62
P_{PS} (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	4,96	35,11
P_E (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	0,00	168,33
$Y_{PS/S}$ (mg.g ⁻¹)	3,03	11,70
$Y_{E/S}$ (mg.g ⁻¹)	0,00	47,14

A Figura 3.24 apresenta os agregados de hifas de *P. ostreatus* (*pellets*) formados após 6 dias de cultivo submerso em biorreator utilizando K_{La} inicial de $10,2 \text{ h}^{-1}$.



Figura 3.24 Biomassa de *P. ostreatus* formada após 6 dias de cultivo submerso em biorreator, em meio contendo água de maceração de milho, extrato de trigo e glicose.

A grande massa de células de *P. ostreatus* cultivado em K_{La} inicial de $10,2 \text{ h}^{-1}$ produzida em reator, associada à produção de exopolissacarídeos, torna as condições de cultivo submerso não usuais. Com a reologia do meio totalmente modificada, a frequência de agitação transmitida não é a mesma ao longo do reator, mantendo as células da superfície do reator praticamente estáticas, e durante o processo, a dificuldade de transferir oxigênio para as células é aumentada. No entanto, estas condições adversas parecem favorecer a produção de exopolissacarídeos. Cabe também salientar que é difícil a distinção entre biomassa, polissacarídeos e exopolissacarídeos. A aparência gelatinosa dos *pellets* leva a dedução que existe exopolissacarídeos aderidos às hifas e este fato faz com que a biomassa e os polissacarídeos sejam superestimados e a concentração de exopolissacarídeo, subestimada.

Quando o K_{La} inicial de $19,3 \text{ h}^{-1}$ é utilizado, o fluxo de ar (2 L/min) é suficiente para manter a saturação em oxigênio do meio. No entanto, quando o K_{La} inicial de $10,2 \text{ h}^{-1}$ é utilizado, o oxigênio é rapidamente consumido (2 dias) e *Pleurotus ostreatus* cresce em limitação de oxigênio, condição esta que favorece tanto o crescimento celular quanto a produção de polissacarídeos intra e extracelulares. A produção de exopolissacarídeos

parece dar um salto exatamente no segundo dia, quando a concentração de oxigênio dissolvido estabiliza-se em zero, mantendo-se constante ao longo do cultivo. Embora alguns autores relatem o consumo deste polímero ao longo do processo (ROSADO, 2002; WISBECK, 2003), neste trabalho isto não foi observado, talvez pela disponibilidade de aproximadamente 5 g.L⁻¹ de glicose residual no meio de cultivo.

Smits *et al.* (2001), em uma revisão sobre a biogênese da parede celular de leveduras, relata que mudanças no metabolismo e na composição de polissacarídeos da parede celular ocorrem sob condições de estresse. Em resposta a alguns sinais de estresse, como a limitação de algum nutriente, stress osmótico ou o causado pela temperatura, a célula ativa uma subunidade regulatória da glicano-sintase, aumentando a produção de glicanos da parede.

É clara a influência da agitação e da aeração sobre todos os parâmetros cinéticos obtidos no cultivo de *P. ostreatus* no meio de cultivo utilizado. Aumentos de 123, 185, 608 e 286% sobre $X_{m\acute{a}x}$, $P_{Xm\acute{a}x}$, P_{PS} e $Y_{PS/S}$, respectivamente, são observados quando o K_{La} inicial de 10,2 h⁻¹ é utilizado. A produção de exopolissacarídeos não foi detectada quando o K_{La} inicial foi de 19,3 h⁻¹, enquanto que 168,33 mg.L⁻¹.dia⁻¹ foram produzidos em K_{La} inicial de 10,2 h⁻¹.

Zadrazil (1978) também observou um decréscimo no rendimento em biomassa com o aumento da concentração de oxigênio no meio de cultivo. No entanto, a remoção completa do oxigênio causa a paralisação do crescimento celular. Também em cultivo sólido, a fase micelial de crescimento é muito mais afetada pelos níveis de CO₂, o produto da respiração celular, do que pelos níveis de O₂.

Marquez-Rocha *et al.* (1999), cultivando *P. ostreatus* observaram uma redução de 15% e 22% na velocidade específica máxima de crescimento quando a aeração foi aumentada de 1 para 1,5 vvm e a agitação foi aumentada de 200 para 400 rpm, respectivamente. Os autores observaram também uma redução no tamanho do *pellet* quando a agitação e a aeração foram aumentadas, ocasionada provavelmente por danos à estabilidade do *pellet*.

Wisbeck (2003) avaliando a influência do K_{La} sobre o cultivo de *P. ostreatus*, observou aumentos na produtividade máxima em exopolissacarídeos em torno de 100% quando o K_{La} foi diminuído de 27 para 15 h^{-1} .

Shu e Wen (2003) estudaram a produção de exopolissacarídeos por *Agaricus blazei*, um fungo conhecido pelas suas propriedades medicinais associadas à produção de β -glicanos e observaram que um aumento na velocidade de agitação afetava negativamente tanto a produção de células como a de polissacarídeos por este fungo.

A Tabela 3.6 apresenta os resultados de concentração de biomassa de *Pleurotus* sp. encontrados por diversos autores. Comparando estes resultados com o melhor resultado obtido neste trabalho (28,1 $g.L^{-1}$), observa-se que este demonstra-se promissor para a produção de biomassa de *P. ostreatus*. A produção de polissacarídeos e exopolissacarídeos ainda é pequena (7,62 $mg.g^{-1}$ e 1,01 $g.L^{-1}$, respectivamente, quando comparada a encontrada por outros autores utilizando diferentes espécies de *Pleurotus*. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho em termos de exopolissacarídeos é superior ao encontrado por outros autores, com a mesma espécie. Além disso, trabalhos futuros podem tornar este meio alternativo, de baixo custo, ainda mais promissor para produção de alimentos funcionais e medicamentos.

Estudos utilizando meios de cultura alternativos vêm sendo realizados por diversos autores para o cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* em meio líquido. Mukhopadhyay *et al.* (2002) testando as mudanças bioquímicas ocorridas no micélio de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em soro de leite desproteinado contendo 4,5% de lactose como substrato, obteve, em 10 dias de cultivo, aproximadamente 8 $g.L^{-1}$ de biomassa seca e Cruz (1997) cultivando *Pleurotus ostreatus*, obteve 3,51 $g.L^{-1}$ de biomassa seca em 8 dias de cultivo. No entanto, Lena & Sermanni (1994) conseguiram obter apenas 0,75 $g.L^{-1}$ de biomassa seca de *Pleurotus ostreatus* em 5 dias de cultivo, utilizando soro de leite como meio de cultivo. Jung *et al.* (2003) avaliaram o crescimento micelial de *P. ostreatus* em meio contendo maçã, pêra ou pêssego ralado. Todos os três meios apresentaram concentração de biomassa superior à obtida com o meio controle, onde as frutas não foram adicionadas. O maior crescimento foi obtido em pêra ralada (9,62 $g.L^{-1}$)

Tabela 3.6 Concentração de biomassa (X), exopolissacarídeos (E) e relação entre a concentração de polissacarídeos e a biomassa (PSX) obtidas por diversos autores no cultivo de fungos do gênero *Pleurotus*.

Autor	Espécie	E (g/L)	PSX (mg.g⁻¹)	X (g.L⁻¹)
COMPERE <i>et al.</i> (1980)	<i>P. ostreatus</i>	0,7		6,0
HADAR & COHEN (1986)	<i>P. sp. var. florida</i>			11,71
MANU-TAWIAH (1988)	<i>P. ostreatus</i>			9,06
CHAHAL (1989)	<i>P. sajor-caju</i>			4,9
FASIDE & OLORUNMAIYE (1994)	<i>P. tuber-regim</i>			3,7
KARACSONYI e KUNIAK (1994)	<i>P. ostreatus</i>		5,05	
DI LENA & SERMANNI <i>et al.</i> (1994)	<i>P. ostreatus</i>			3,75
BURNS <i>et al.</i> (1994)	<i>P. sp. var. florida</i>	1,16		11,5
GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (1996)	<i>P. ostreatus</i>	0,17		
CRUZ (1997)	<i>P. ostreatus</i>			3,51
MAZIERO <i>et al.</i> (1999)	<i>P. flabellatus</i>			8,5
	<i>P. ostreatus</i>			4,5
	<i>P. ostreatoroseus</i>			9,0
	<i>P. sajor-caju</i>			10,39
	<i>P. sp. var. florida</i>	3,8		11,72
MUKHOPADHYAY <i>et al.</i> (2003)	<i>P. sajor-caju</i>			8,0
CORRÊA <i>et al.</i> (2003)	<i>P.ostreatus</i>			3,2
WISBECK (2003)	<i>P. ostreatus</i>	0,58		12,87
WU <i>et al.</i> (2003)	<i>P. tuber-regim</i>			13,3
WU <i>et al.</i> (2004)	<i>P. tuber-regim</i>			9,4
ROSADO <i>et al.</i> (2003)	<i>P. ostreatus var.florida</i>	1,4		22,89
	<i>P. ostreatoroseus</i>	5,8		16,8
JUNG <i>et al.</i> (2003)	<i>P. ostreatus</i>			9,62
ZHANG <i>et al.</i> (2004a)	<i>P. tuber-region</i>		40,0	
WANG <i>et al.</i> (2005)	<i>P. citrinopieatus</i>	0,56		6,41
Este trabalho (meio 11)	<i>P. ostreatus</i>	1,01	7,62	28,1

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do micélio e do caldo de cultivo de *P. ostreatus*

A Figura 3.25 mostra o percentual de inibição do crescimento dos microrganismos teste quando cultivados em meio contendo 50% de extratos do micélio de *P. ostreatus* e o caldo de cultivo de *P. ostreatus*.

A Figura 3.26 mostra o crescimento celular, medido em termos de absorvância, dos microrganismos teste *E. coli*, *B. subtilis* e *C. albicans*, quando incubados em meio contendo a infusão aquosa a quente do micélio (EI), o caldo de cultivo (CC) e polissacarídeos extraídos do micélio (EP) de *P. ostreatus*. As replicatas das leituras de absorvância a 540 nm das suspensões de células dos microrganismos teste, cultivados em diferentes meios, encontram-se no Anexo H.

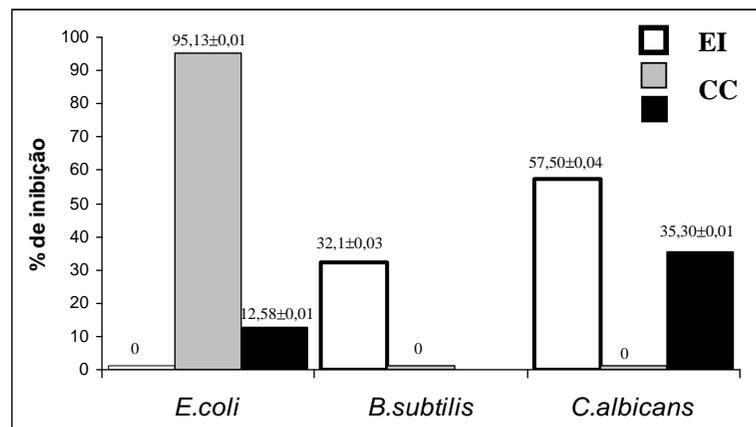


Figura 3.25 Percentual de inibição do crescimento dos microrganismos teste obtido com a infusão a quente (EI) e com a solução de polissacarídeos (EP) do micélio de *P. ostreatus* e com o caldo de cultivo bruto do fungo (CC).

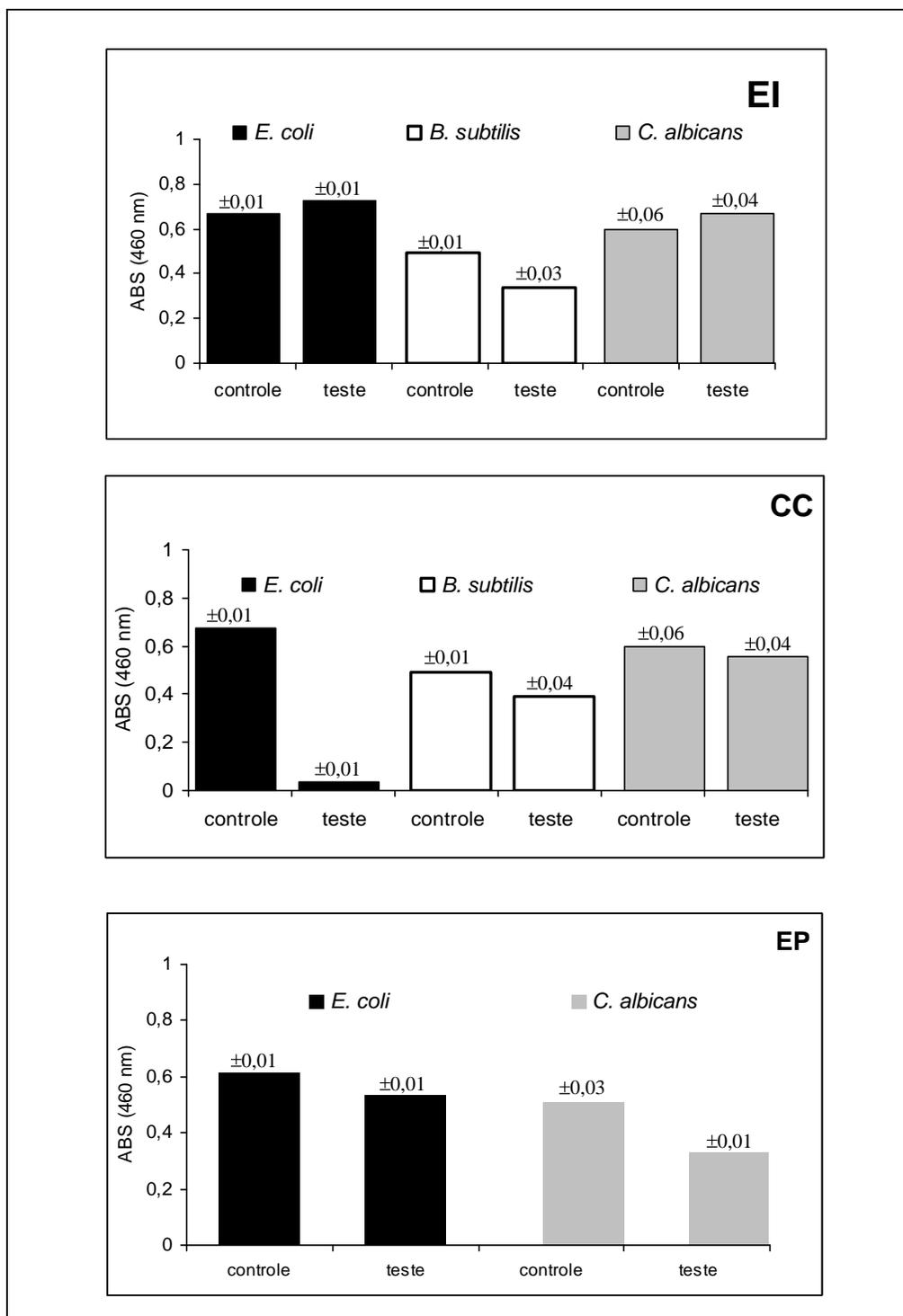


Figura 3.26 Crescimento celular (absorvância a 460 nm) de *E. coli*, *B. subtilis* e *C. albicans* em meio contendo 50% de EI, CC e EP.

E. coli apresentou diferença significativa no crescimento em relação ao meio controle, quando cultivada em meio contendo 50% do caldo de cultivo de *P. ostreatus* ou quando cultivada em meio contendo 50% de polissacarídeos extraídos do micélio deste fungo.

O caldo de cultivo bruto só apresentou atividade contra *E. coli* (95,13%). Paccola *et al.* (2001) também não observaram atividade do caldo de cultivo de *P. ostreatus* contra *C. albicans*. Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, Bianco (1981), ao analisar a ação antimicrobiana do micélio e do caldo de cultivo de *P. ostreatus*, verificou ação antimicrobiana apenas contra *B. subtilis*. Wisbeck *et al.* (2002) também só encontraram atividade antimicrobiana do caldo de cultivo de *P. ostreatus* contra *C. albicans*. Como a linhagem utilizada neste trabalho foi a mesma utilizada por Wisbeck (2002), apenas utilizando outro meio de cultivo e outra metodologia de análise (difusão em discos, que utiliza baixíssimas concentrações da substância a ser avaliada), pode-se concluir que o meio de cultivo e a metodologia de análise podem influenciar significativamente no resultado da atividade antimicrobiana deste fungo. O efeito antimicrobiano do caldo de cultivo de *P. ostreatus* pode estar associado à presença de ácido benzóico, álcool benzílico, anisaldeído e terpenos, conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas como já havia sido observado por Gutiérrez *et al.* (1994) e Lorenzen e Anke (1998).

Os polissacarídeos extraídos do micélio de *P. ostreatus* apresentaram um pequeno efeito inibitório sobre *E. coli* (12,58%) quando comparado ao caldo de cultivo bruto (95,13%), sugerindo que os compostos antimicrobianos presentes no caldo de cultivo tenham outra natureza química que não carboidratos. Efeito mais significativo dos polissacarídeos extraídos do micélio foi obtido contra a levedura *C. albicans* (35,3%). Não foi possível observar o efeito inibitório dos polissacarídeos contra *B. subtilis*. Gunde-Cimerman (1999) já havia observado que polissacarídeos de baixo peso molecular contidos no micélio de *P. ostreatus* poderiam apresentar atividade antibiótica, anticancerígena e antiviral.

Compostos bioativos presentes na infusão aquosa do micélio de *P. ostreatus* foram capazes de inibir razoavelmente o crescimento da bactéria Gram-positiva *B. subtilis* (32,1%) e da levedura *C. albicans* (57,5%). Garcia *et al.* (1998) também observaram inibição do crescimento de *E. coli* e *B. subtilis* quando avaliaram a atividade

antimicrobiana do micélio de *P. ostreatus*. Coutinho *et al.* (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos (infusão aquosa a quente) do micélio desidratado de *P. ostreatus*, cultivado em meio contendo extrato de trigo e glicose. O extrato promoveu uma inibição de 57,5% no crescimento de *E. coli* e de 87,21% no crescimento de *B. subtilis*, não apresentando atividade contra *C. albicans*. Neste trabalho, um extrato de micélio fresco da mesma linhagem fúngica apresentou 57,5% de inibição, sugerindo a perda de substâncias bioativas no processo de desidratação. Por outro lado, neste trabalho, o crescimento de *E. coli* não foi afetado pelo extrato obtido com a infusão a quente. Extratos (infusão aquosa a quente) de corpos frutíferos frescos de *P. ostreatus* também foram avaliados por Cardoso & Israel (2005), apresentando atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis* e *C. albicans*, sugerindo um maior potencial antimicrobiano de extratos obtidos dos corpos frutíferos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam o caldo de cultivo e a infusão aquosa do micélio de *P. ostreatus* como os mais indicados para inibir o crescimento de *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente. Concentrações mínimas para a inibição devem ser avaliadas em experimentos futuros.

Conclusões

- Nos experimentos para avaliação de um meio de cultivo alternativo para produção de biomassa de *P. ostreatus*, comparando-se as produtividades máximas em biomassa obtidas para os diferentes meios de cultivo avaliados (TD, POL-MIL e POL) foi possível concluir que o meio TD, nas condições avaliadas neste trabalho, mostra-se mais propício para a produção de células de *Pleurotus ostreatus*. Além disso, o baixo custo do meio TD torna-o atraente para o processo industrial de produção de biomassa;
- Nos experimentos para avaliação de diferentes concentrações de glicose adicionadas ao extrato de trigo, dentro da faixa de concentração de glicose testada (5, 10 15 e 20 g.L⁻¹), o extrato de trigo contendo 20 g.L⁻¹ de glicose proporciona os melhores resultados em termos de produtividade máxima em biomassa;
- Nos experimentos de avaliação do tipo da fonte de nitrogênio orgânico (MIL ou YE), observa-se que a concentração máxima de biomassa é alcançada nos experimentos onde a água de maceração de milho (MIL) foi utilizada. No entanto, esta variável não apresenta efeitos significativos sobre a produtividade máxima em biomassa e sobre o fator de conversão de substrato em biomassa. Quanto à produtividade global em polissacarídeos, melhores resultados são encontrados quando extrato de levedura é utilizado;
- Nos experimentos de avaliação da concentração da fonte de nitrogênio orgânico, observa-se que o aumento do valor desta variável promove um aumento de todas as variáveis avaliadas;

- O uso de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio inorgânico apresenta um claro efeito negativo sobre todos os parâmetros avaliados, com exceção da produtividade global em polissacarídeos;
- A concentração de glicose no nível superior (40 g.L^{-1}) proporciona os melhores resultados em termos de produtividade máxima em biomassa e de concentração máxima de biomassa. No entanto, o aumento da concentração de glicose apresenta um efeito negativo sobre a relação entre a concentração de polissacarídeos e a concentração de biomassa e sobre o fator de conversão de substrato em biomassa;
- As melhores condições em termos de concentração máxima de biomassa e de fator de conversão de substrato em biomassa foram alcançadas quando o extrato de trigo foi suplementado com 20 g.L^{-1} de água de maceração de milho e 40 g.L^{-1} de glicose, na ausência de sulfato de amônio;
- A melhor condição em termos de produtividade máxima em biomassa foi alcançada quando o extrato de trigo foi suplementado com 5 g.L^{-1} de extrato de levedura e 40 g.L^{-1} de glicose, na ausência de sulfato de amônio;
- Embora os resultados apontem para o uso de extrato de levedura para obtenção de polissacarídeos, o elevado custo do extrato de levedura aliado a pequena diferença ($\sim 18\%$) encontrada entre as produtividades em polissacarídeos obtidas com os meios contendo extrato de levedura (meio 9 – $20,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e água de maceração de milho (meio 11 - $17,01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), levou a escolha deste último como sendo o mais apropriado para a produção de biomassa e polissacarídeos por *P. ostreatus* em cultivo submerso;

- A comparação de dois diferentes valores de K_{La} inicial (10,2 e 19,3 h^{-1}) mostrou que o desempenho de *P. ostreatus* tanto em termos de produção de biomassa como de produção de polissacarídeos é extremamente favorecido pelo K_{La} inicial de 10,2 h^{-1} ;
- Após a comparação dos resultados obtidos com o extrato de trigo suplementado nas condições definidas neste trabalho, com os trabalhos dos demais autores citados na literatura, é possível confirmar a viabilidade de utilização deste meio no processo de produção de biomassa e polissacarídeos de *P. ostreatus*;
- Os resultados obtidos neste trabalho indicam o caldo de cultivo e a infusão aquosa do micélio de *P. ostreatus* como os mais indicados para inibir o crescimento de *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente. Concentrações mínimas para a inibição devem ser avaliadas em experimentos futuros.

Perspectivas

- Ampliar a faixa de concentração de glicose e milhocina estudadas para obtenção de valores ótimos de produtividade em biomassa e polissacarídeos;
- Avaliar o uso do extrato de levedura bruto obtido de cervejarias na suplementação do extrato de trigo;
- Estudar novos valores de K_{La} inicial, com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a influência da agitação e da aeração no crescimento e na produção de polissacarídeos por *P. ostreatus*;
- Avaliar a cinética de produção de glicano-sintases por *P. ostreatus*;
- Caracterizar os polissacarídeos extraídos do micélio de *P. ostreatus*;
- Avaliar as propriedades medicinais dos polissacarídeos obtidos através de testes *in vitro*;
- Avaliar as concentrações mínimas de inibição do caldo de cultivo e da infusão aquosa do micélio de *P. ostreatus*.

Referências

ABE, É.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Relações entre temperatura de pasteurização e contaminação do composto durante o cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacquim Fries) Kummer. **Científica**, São Paulo, v.20, n.2, p.423-433, 1992.

BANO, Z; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post harvest physiology, preservation and role as human food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 2, p.87-158, 1988.

BELTRAN, G.M.J., ESTARRON, E.M., OGURA, T. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.10, p.4049-4052, 1997.

BENJAMIN, D. R. **Mushrooms:poisons and panaceas: a handbook for naturalists, mycologists, and physicians**. New York: W. H. Freeman and Company, 1999.

BER, L. **Yeast Derived Beta-1,3-D-Glucan: An Adjuvant Concept**. Disponível em: <http://www.tldp.com/issue/184/Yeast%20Derived%20Beta.htm> Acesso em jun, 2004.

BEROVIC, M.; HABIJANIC, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 77-86, 2003.

BIANCO, C.M.A. Basidiomycetes in relation to antibiotic II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. **Journal of Bacteriology, Virology and Immunology**, n. 74, p. 267-274, 1981.

BISARIA, R., MADAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. **Enzyme Microbiology Technology**, v.5, p.251-259, 1983.

BOBEK, P. OZDIN, L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on composition and distribution of lipoproteins in rats fed high-cholesterol and low-cholesterol diet. **Bratislava**, v. 49, n. 3, p. 405 – 410, 1994.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Mechanism of hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats: Reduction of cholesterol absorption and increase of plasma cholesterol removal. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 33, p. 44 – 50, 1994.

BOBEK, P., GINTER, E., KUNIAK, L., BABALA, M.D., JURCOVICOVÁ, M., OZDÍN, L., CERVEN, J. Effect of mushroom *Pleurotus ostreatus* and isolated fungal polysaccharide on serum and liver lipids in Syrian Hamsters with hyperlipoproteinemia. **Nutrition**, v.7, n.2, p.105-108, 1991 a.

BOBEK, P., GINTER, E., JURCOVICOVÁ, M., KUNIAK, L. Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. **Annual Nutritional Metabolism**, v.35, p.191-195, 1991 b.

BOBEK, P., GINTER, E., JURCOVICOVÁ, M., OZDÍN, L.; MEKINOVÁ, D. Effect of oyster fungus (*Pleurotus ostreatus*) on serum and liver lipids of Syrian hamsters with a chronic alcohol intake. **Physiology Research**, v.40, p. 327-332, 1991 c.

BOHN, J.A., BeMILLER, J.N. (1,3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review on structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, n.28, p.3-14, 1995.

BONATTI, M. **Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agro-industriais**. 2001. 148p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BONATTI, M; Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus –sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista saúde e meio ambiente**, v.4, n.1, p. ,2002

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* 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. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 1 ed. São Paulo: Ícone, 1995.

BUGARSKI, D.; GVOZDENOVIC, D. J.; CERVENSKI, J.; TAKAE, A. Effect of major environmental conditions on the development of the mycelium and growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Acta of Horticulture**, v. 579, 2002.

BURLA, G.; GARZILLO, A. M.; LUNA, M.; CARDELLI, L. E.; SCHIESSER, A. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 89-94, 1992.

BURNS, P.J., YEO, P., KESHAVARZ, T., ROLLER, S., EVANS, C.S. Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp. *Florida*; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. **Enzyme Microbiology Technology**, n.34, p. 566-572, 1994.

BURNS, P.J. **Characterization of an extracellular polysaccharide from *Pleurotus florida***. 1993. 203p. Ph.D. Thesis - University of Westminster, London, 1993.

BUSWELL, John A; CHANG, Shu-ting. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grow on soybean waste. **Biothechnology Letters**, v. 16, n.12, p. 1317-1322, 1994.

CARDOSO, C.B.; ISRAEL, L. **Avaliação da atividade antimicrobiana e potencial polissacarídico dos extratos aquosos dos corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 e *Pleurotus sajor-caju* DSM 019**. 2005. 55p. Monografia (Graduação em Farmácia Bioquímica) – Curso de Farmácia Bioquímica, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2005.

CASSOU, R. D.; WISBECK, E.; GERN, R.M.M.; FURLAN, S. A. Avaliação do crescimento micelial de cogumelos do gênero *Pleurotus* para produção de “spawn”. **Caderno de Iniciação à Pesquisa** -Univille, v. 3, p. 70-72, 2001.

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. **Italian Journal of Food Science**, n1, p.9-15, 1992.

CHAHAL, D. S. Production of protein-rich mycelial biomass of a mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, on corn stover. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 334-338, 1989.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutritional Review**, v.54, n.11, p.91-93, 1996.

CHANG, S.T. Global impact of edible and medicinal mushroom on human welfare in the 21st century: non-green revolution. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v. 1, p. 1-7, 1999.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J-M ; STRECKER, G. ; CHAVANT, L. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 413-415, 1996.

CHEUNG, N-K. V.; MODAK, S.; VICKERS, A.; KNUCKLES, B. Orally administered β -glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 51, p. 557-564, 2002.

CHEUNG, P.C.K. Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 61-65, 1997.

COHEN R., PERSKY L., HADAR Y. Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.5, p. 582-594, 2002.

COMPERE, A.L.; GRIFFITH, W.L.; GRENE, S.V. Polymer production by *Pleurotus*. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 21, p. 461-469, 1980.

CORRÊA, R. C.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Estudo do preparo do pré-cultivo de *Pleurotus ostretus*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa**, v.5, p. 144-147, 2003.

COUTINHO, P.B.N.; FURLAN, S.A. ; WISBECK, E.; GERN, R.M.M. Avaliação do potencial terapêutico de *Pleurotus ostreatus*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa**, v.6, p. 60-63, 2004.

CRUZ, R. B. **Utilização do soro de leite para produção de micélio de *Pleurotus ostreatus***. 1997. 63 f. Dissertação (Mestrado Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DI LENA, G. & SERMANI, G. Whey permeate as a growth medium for *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 391-393, 1994.

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.

EYAL, J. Mushroom mycelium grown in submerged culture: potential food applications. In: GOLDBERG, I., Willian, R. **Biotechnology and Food Ingredients**. New York: V.N. Reinold, 1991. p. 31-64.

FANG, FANG, Q. H.; ZHONG, J. 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, 2002.

FASIDI, I. O. & OLORUNMAIYE, K. S. Studies on the requirement for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian mushroom. **Food chemistry**, v. 50, p. 397-401, 1994.

FREIMUND, S; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n.2, p. 159-171, 2003.

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.

GARCIA, I.; CISNEROS, F.; SEDRÉS, J;M. Estudio de la actividad antimicrobiana em el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184. **Alimentaria**, p-63-65. 1998.

GARZILLO, A. M. V.; DI PAOLO, S.; RUZZI, M.; BUONOCORE, V. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 476-481, 1994.

GERASYMENYA, V.P.; EFREMENKOVA, O.V.; KAMZOLKINA, O.V.; BOGUSH, T.A.; TOLSTYCH, I.V.; ZENKOVA, V.A. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kumm. Extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.2, 2002.

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

GO, S.J., YOU, C.H., PARK, Y.H. Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen nutrition on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. and *Pleurotus ostreatus* (Fr). qué. **Korean Journal of Mycology**, v. 12, n. 1, p. 15-20, 1984.

GORIN, P.A.J, BARRETO, B.E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINALL, G.O. (ed.) **The Polysaccharides**, vol 2. New York: Academic Press, 503p., 1983.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.I., Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1., p. 69-80, 1999.

GUTIÉRREZ, A., CAMELO, L.; PRIETO, A., MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 1783-1788, 1994.

GUTIÉRREZ, A., MARTÍNEZ, M.J., ALMENDROS, G., GONZÁLEZ-VILA, F.J., MARTÍNEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **The Science of the Total Environment**, v. 167, p. 315-328, 1995.

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

HADAR, Y., COEHN-ARAZI, E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n.6, p. 1352-1354, 1986.

HARA M., YOSHIDA, M., MORIMOTO, M., NAKANO, H. 6-deoxylludin M, a new antitumor antibiotic: fermentation, isolation and structural identification. (Communications to the Editor) **The Journal antibiotics**, Vol. XL, n. 11, p.1643-1646, 1987.

HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J.; YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 145-150, 2003.

HOCH, I. E. **Avaliação da substituição do extrato de levedura por milhocina no cultivo de *Zymomonas mobilis* para a produção da enzima glicose-frutose oxidoreductase**. Joinville, UNIVILLE, 1997. Trabalho de Conclusão de Estágio.

HOSSAIN, S.; HASHIMOTO M.; CHOUDURY EK., ALAN N.; HUSSAIN S.; HASAR CHOUDHURY SK; MAHMUD I. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherog lipid in hypercholesterolemic rats. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, 30(7): 470-475, 2003.

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

IKEKAWA, T., UEHARA, N., MAEDA, Y., NAKANISHI, M., FUKUOKA, F. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms. **Cancer Research**, n. 29, p. 734-735, 1969.

JAIC, D.; SIROKA, P.; FEJES, J.; CERESNAKOVA, Z. Effect of three strains of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. On chemical composition and rumen fermentation of wheat straw. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 45, p. 227-282, 1999.

JUNG, G.T.; JU, I.O.; RYU, J.; CHOI, J.S.; CHOI, Y.G. Mycelial yield of *Pleurotus ostreatus* using thinned apple, pear, and peach on submerged culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 5, p. 286-290, 2003.

KAKKAR, V.K.; GARCH, H.S.; DHANDA, S.; MAKKAR, G.S. Mushroom harvested spent straw for buffaloes. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v.7, n.4, p.267-272, 1990.

KARÁCSONYI, S., KUNIAK, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. **Carbohydrate Polymers**, n. 24, p. 107-111, 1994.

KARNEZIS, T., McINSTOCH, M., WARDAK, A.Z., STANISICH, V.A., STONE, B.A. The biosynthesis of β -glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, n.66, p. 211-227, 2000.

KIM, S.W.; HWANG, H.J.; PARK, J.P.; CHO, Y.J.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 56-61, 2002.

KIM, D. H.; YANG, B. K.; JEONG, S. C.; PARK, J. B.; CHO, S. P.; DAS, S.; YUN, J. W.; SONG, C. H. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the

submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 513-517, 2001.

KRIZKOVA, L.; DURACKOVA, Z.; SANDULA, J.; SLAMENOVA, D.; SASINKOVA, V.; SIVONOVA, M.; KRAJKOVIC, J. Fungal β - (1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2751-2756, 2003.

KUMADA, K. A multi-institutional prospective study of Lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effects on prolongation of survival and improvement of quality of life. **Hepato-Gastroenterology**, v. 46, p. 2662-2668, 1999.

LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 574-581, 2003.

LEIFA, F. *et al.* **Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biomassa de *Agaricus blazei* LPB03 em fermentação submersa.** VII Encontro Regional Sul de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Paraná, 2001.

LIU, F.; Ooi, V. E. C.; LIU, W. K.; CHANG, S. T. Immunomodulation and antitumor activity of polysaccharide-protein complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 621-624, 1996.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; FUNG, M. C. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1005-1011, 1999.

LOMBERH, M. L.; SOLOMKO, E. F.; BUCHALO, A. S.; KIRCHHOFF, B. **Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures.** Disponível em: http://www.mushworld.com/sub_en.html. Acesso em: maio, 2004.

LORENZEN, K. and ANKE, T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. **Current Organic Chemistry**, v.2, p. 329-364, 1998. LORENZEN e ANKE, 1998.

MADAN, M., VASUDEVAN, P., SHARMA, S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different agro-wastes. **Biological Wastes**, v.22, p.241-250, 1987.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock. Biology of Microorganisms**. 9 ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

MANU-TAWIAH, W., MARTIN, A.M. *Pleurotus ostreatus* requirements for P, K, Mg and Mn in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 34, p. 620-624, 1987.

MARTIN, A.M. Study of the growth and biomass composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food Science and Human Nutrition**, p. 239-248, 1992.

MATTHYSSE, A.G.; THOMAS, D.L.; WHITE, A.R. J. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 1076 - 1081, 1995.

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.

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.

MIZUNO, M; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate T-cell subsets in mice. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 434-437, 1998.

MORAIS, H., RAMOS, C., MATOS, N., FORGÁCS E., CSERHÁTI, T., ALMEIDA, V., OLIVEIRA, J., DARWISH, Y., ILLÉS, Z. Liquid chromatographic and

electrophoretic characterization of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 111-119, 2002.

MOUYNA I; HARTLAND RP; FONTAINE T; DIAQUIN, M; LATGÉ JP. A β (1-3) glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is an homolog of the yeast Bgl2p. **Microbiology**, v. 144, p.3171-3180, 1998.

MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. **Process Biochemistry**. Article in press (www.elsevier.com/locate/procbio), 2003.

NOSAL'OVA, V., BOBEK, P., CERNA, S., GALBAVY, S., STVRTINA, S. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. **Physiology Research**, v. 50, n. 6, p. 575-581, 2001.

OBODAI, M., CLELAND-OKINE, J., VOWOTOR, K.A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v, 30, n.3, p. 146-149, 2003.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; SASAEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, p. 1-7. Article in press (www.elsevier.com/locate/soilbio).

OKUDA, T.; YOSHIOKA, Y.; IKEKAWA, T.; CHIHARA, G.; NISHIOKA, K. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. **Nature New Biology**, v. 238, n. 80, p. 59-60, 1972.

OLSVIK, E.; TUCKER, K.G.; THOMAS, C.R.; KRISTIANSEN, B. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 2, p. 1046-1052, 1993.

OOI, V.E.C.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 195-206. 1999.

OSO, B.A. *Pleurotus tuber regium* from Nigéria. **Mycologia**, n. 20, p. 271-279, 1977.

PACCOLA, E.A.S.; MAKI, C.S.; NOBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 23, n.3, p. 176-178, 2001.

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

PATRABANSH, S; MADAN, M. Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analyses of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer on different bio-wastes. **Acta Biothechnology**, v.17, n. 2, p. 107-122, 1997.

PELCZAR, Michael; REID, Roger; PEREIRA, Manuel Adolpho May. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J., McDOUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 3, p. 178-192, 1993.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, v.340, n. 4, p. 629-636, 2005.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2002.

PUTZKE, Jair; PUTZKE, Marisa Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. Grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, v. 80, p. 371-375, 2003.

RAPER, C.A. *Agaricus bitorquis* – Biological Nature. In: **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**, S.T. Chang & W, Hayes (eds.), p. 365-369. Academic Press, New York, 1978.

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.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.S.R. **Microbiologia prática: Roteiro e Manual: bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1998.

RODRÍGUEZ, E.; NUERO, O.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 909-916, 2004.

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 β-D-galactan and β-D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSADO, F.R., GERMANO, S., CARBONERO, E.R., DA 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 of Basic Microbiology**, v. 43, n.3, p. 230-237, 2003.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K.N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 5, p. 537-544, 2005.

SANTOS, V.M.C.S. **Contribuição ao estudo da produção de *Pleurotus* spp. Em resíduos lignocelulósicos**. 2000. 141p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

SCHERBA, V.V., BABITSKAY, V.G., TRUCHONOVEC, V.V., FOMINA, V.I., BISKO N.A., MITROPOLSKAYA, Y.N. The influence of the cultivation conditions on the chemical composition of medicinal mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. And *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p. 181-185, 1999.

www.sigma-aldrich.com.br - Acesso em 25/10/2005.

SHU, C-H. e WEN, B-J. Enhanced shear protection and increased production of an anti-tumor polysaccharide by *Agaricus blazei* in xanthan-supplemented cultures. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 873-876, 2003.

SILVEIRA, Marcia Luciana Lange. **Comparação entre o desempenho do inóculo sólido e inóculo líquido para cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SMITS, G.J.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F.M. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. **Microbiology**, v. 147, p. 781-794, 2001.

SOLOMKO, E. F.; ELISEEVA, G. S. Biosynthesis of group B vitamins by the fungus *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Prikladnaya Biokhimiya**, v.24, n. 2, p. 164-169, 1988.

SOLOMONS, G. L. Submerged culture production of mycelial biomass. In: Smith, J. E. & Berry, D. R. (Eds). **The Filamentous Fungi**. vol. 1 - Industrial Mycology. Edward Arnold, London, 1975.

SONG, C. H.; JEON, Y. J.; YANG, B. K.; RA, K. S.; KIM, H. I. Anti-complementary activity of endo-polymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 8, p. 741-744, 1998.

TAM, S. C.; YIP, K. P.; CHANG, F.; CHANG, S. T. Hypotensive and renal effects of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Life Sciences**, v. 38, p. 1155-1161, 1986.

TANABE, S. Comparison of phenoloxidase activities during the cultivation of several Basidiomycetes. **Review in Agriculture Biology Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 3061-3063, 1989.

TAWIAH, M. W.; MARTIN, A. M. Nitrogen sources and the growth response of *Pleurotus ostreatus* Mushroom Mycelium. **Canadian Institute of Food Science Technology Journal**, v. 21, n 2, p. 194-199, 1987.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002. 827 p

TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. **Microbiologia**. 2. ed. Sao Paulo: Atheneu, 1996.

TRABULSI, R.T.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

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

TRIPATHI, J. P.; YADAV, J. S. Optimisation of solid substrate fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleurotus ostreatus*: a pilot effort. **Animal Feed Science and Technology**, v. 37, p. 59-72, 1992.

UKAI, S.; KIHU, T.; HARA, C.; KURUMA, I.; TANAKA, Y. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effects of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. **Journal Pharm. Dyn.**, v. 6, p. 983-990, 1983.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. 3.ed. Rio de Janeiro. Campus, 1980.

WANG, J-C.; HU, S-H.; LIANG, Z-C. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 759-766, 2005.

WASSER, S.P., WEIS, A. L. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. **Critical Reviews in Immunology**, n.19, p. 65-96, 1999.

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**. 2003. 175p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISE, W. S. J. **General Microbiology**, v.5, p. 167, 1951. In: RAINER, B. W. Determination of volumetric oxygen transfer coefficient k_{La} in bioreactors. **Chemistry and Biochemistry Engineering**, v. 4, n. 4, p. 185-196, 1990.

WU, JIN-ZHONG; CHEUNG, P. C. K.; WONG, KA-HING; HUANG, NIAN-LAI. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer – Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 389-393, 2003.

WU, JIN-ZHONG; CHEUNG, P. C. K.; WONG, KA-HING; HUANG, NIAN-LAI. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer – Part 2:

effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, v. 85, p. 101-105, 2004.

XU, C-P; KIM, S-W; HWANG, H-J; CHOI, J-W, YUN, J-W. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1025-1030, 2003.

YILDIZ, A.; ERTEKIN, A. S. An experimental study of mycelial development periods of some *Pleurotus* species, **Mushroom Research**, v. 5, p. 81 – 88, 1996.

YOSHIOKA, Y.; IKEKAWA, T.; NODA, M.; FUKUOKA, F. Studies on antitumor activity of some fractions from basidiomycetes. I. An antitumor acidic polysaccharide fraction of *P. ostretus* (Fr.) Quél. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 6, p. 1175-1180, 1972.

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

ZADRAZIL, F. Cultivation of *Pleurotus*. In: CHANG, S.T., HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press INC. 1978, p. 521-557.

ZADRAZIL, F. Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. **European Journal Applied Microbiology**, v. 1, p.327-335, 1975.

ZERVAKIS, G.; BALIS, C. Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. **Micol. Neotrop.** v. 5 , p. 39-47, 1992.

ZERVAKIS, G.; PHILIPPOUSSIS, A.; IOANNIDOU, S.; DIAMANTOPOUPOU, P. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species lignocellulosic substrates. **Folia Microbiology**, v. 46, p. 231-234, 2001.

ZHANG, J., WANG, G., LI, H., ZHUANG, c., MIZUNO, T., ITO, H., SUZUKI, C., OKAMOTO, H., LI, J. Antitumor Polysaccharides from a Chinese Mushroom, “*Yuhuangmo*”, the Fruiting Body of *Pleurotus citrinopileatus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, n.58, v.7, p. 1195-1201, 1994.

ZHANG, M., ZHANG, L., CHEUNG, P.C. Molecular mass and chain conformation of carboxymethylate derivatives of beta-glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Biopolymers**. v. 68, n.2, p.150-159, 2003.

ZHANG, M.; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p.123-128, 2004a.

ZHANG, M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C; ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydrate Research**. Article in Press. www.sciencedirect.com., 2004b.

ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; SHIMADA, A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y.; LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) sings. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 6, p. 901-906, 1993.

Anexos

Anexo A – Curvas de calibração

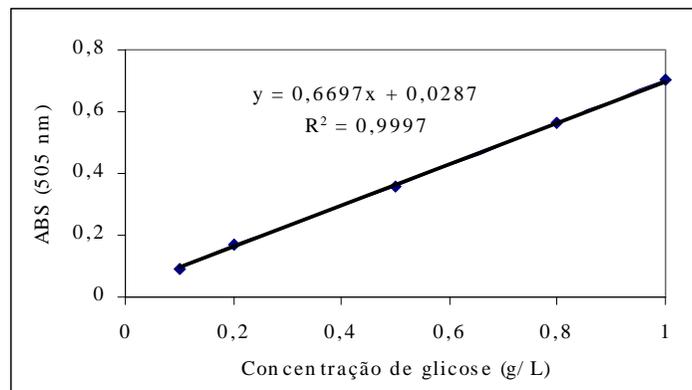


Figura A.1 Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de glicose pelo método enzimático GOD/POD.

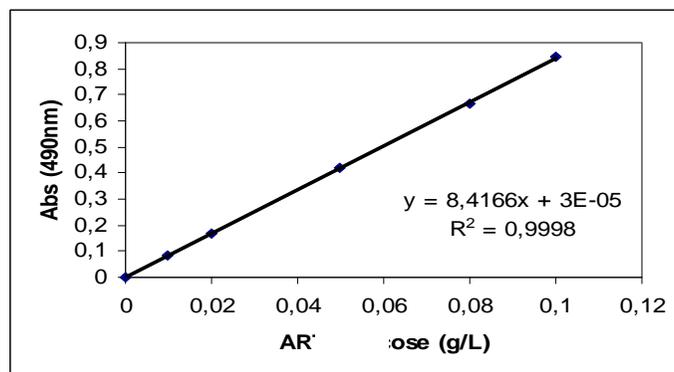


Figura A.2 Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de polissacarídeos e exopolissacarídeos (açúcares solúveis totais) pelo método fenol-sulfúrico.

Anexo B – Dados experimentais dos experimentos para avaliação do uso de meios de cultivo alternativos na produção de biomassa de *P. ostreatus*

Tabela B.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio POL, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo	X (g/L) – B	X (g/L) – C	S (g/L)- A	S (g/L) – B	S (g/L) – C
0	0,80	0,80	20,29	19,96	21,60
2	0,87	0,80	20,67	22,25	21,50
4	1,19	1,25	21,11	21,35	21,08
6	1,68	3,70	19,35	19,60	19,20
8	4,93	4,99	14,15	15,31	16,50
10	6,75	7,34	6,10	5,71	8,20
12	6,93	8,35	2,20	2,86	2,04
POL A	$X = 0,0003t^5 - 0,0093t^4 + 0,1086t^3 - 0,3928t^2 + 0,4799t + 0,7208$				
POL B	$X = 3E-05t^5 - 0,0013t^4 + 0,0106t^3 + 0,0839t^2 - 0,2059t + 0,8286$				
POL C	$X = 0,0005t^5 - 0,0142t^4 + 0,13t^3 - 0,3411t^2 + 0,3118t + 0,7506$				

Tabela B.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio POL-MIL, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo	X (g/L) -A	X (g/L) - B	X (g/L) -C	S (g/L)- A	S (g/L)- B	S (g/L)- C
0	1,22	1,22	1,22	20,23	20,23	20,23
2	0,97	2,46	1,01	19,1	19,5	18,98
4	3,18	3,57	3,55	16,4	17,21	16,11
6	6,26	4,85	5,72	16,25	13,81	11,71
8	7,14	7,71	7,63	11,95	10,25	10,44
10	7,31	7,25	10,81	8,04	5,29	6,96
12	14,79	15,3	15,27	4,83	6,11	4,81
POL-MIL	$X = -0,0002t^5 + 0,0068t^4 - 0,0871t^3 + 0,5294t^2 - 0,46t + 1,1797$					
POL-MIL	$X = -4E-05t^5 - 0,0007t^4 + 0,0349t^3 - 0,2237t^2 + 0,8613t + 1,4858$					
POL-MIL	$X = -0,0002t^5 + 0,0066t^4 - 0,0926t^3 + 0,6045t^2 - 0,7663t + 1,4474$					

Tabela B.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o meio TD, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo	X (g/L) -A	X (g/L) -A	X (g/L) -A	S (g/L)- A	S (g/L)- A	S (g/L)- A
0	1,44	1,44	1,44	24,79	24,79	24,79
2	2,05	1,85	2,23		23,09	
4	8,51	8,22	8,22	16,96	19,32	
6	8,56	9,95	9,85	15,34	13,57	16,25
8	9,01	9,07	10,72	19,17	17,22	15,89
10	9,92	10,98	9,16	12,01	9,05	10,67
12	10,38	9,38	9,23	10,18	9,65	9,13
TD A $X = 6E-05t^6 - 0,0031t^5 + 0,0586t^4 - 0,524t^3 + 2,0679t^2 - 1,4055t + 1,5038$						
TD B $X = -0,0004t^5 + 0,0146t^4 - 0,2135t^3 + 1,2139t^2 - 0,8875t + 1,5172$						
TD C $X = -0,0003t^5 + 0,0132t^4 - 0,1902t^3 + 1,0485t^2 - 0,4494t + 1,392$						

Tabela B.4 $X_{m\acute{a}x}$, X_0 , S_f , $S_{Xm\acute{a}x}$, S_i , $P_{Xm\acute{a}x}$, P_X , $Y_{x/s}$ e $\mu_{Xm\acute{a}x}$ para os experimentos para avaliação do uso de meios de cultivo alternativos na produção de biomassa de *P. ostreatus*

EXP	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	X_0 (g.L ⁻¹)	S_f (g.L ⁻¹)	$S_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	S_i (g.L ⁻¹)	$P_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	$\mu_{Xm\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)
POL A	7,08	0,72	2,21	2,23	20,30	0,61	0,57	0,35	0,45
POL B	8,38	0,83	3,05	3,05	21,15	0,65	0,63	0,42	0,40
POL C	6,41	0,75	1,96	8,52	21,56	0,63	0,6	0,43	0,47
POL	7,29	0,77	2,41	4,60	21,00	0,63	0,60	0,40	0,44
POL-MIL	14,89	1,18	4,90	4,90	20,30	1,14	1,14	0,89	0,46
POL-MIL	15,60	1,49	4,13	4,13	20,47	1,18	1,18	0,86	0,23
POL-MIL	15,32	1,45	4,76	4,76	20,18	1,16	1,16	0,90	0,44
POL-MIL	15,27	1,37	4,60	4,60	20,32	1,16	1,16	0,88	0,38
TD A	9,82	1,50	6,56	9,18	24,07	1,51	0,67	0,56	0,83
TD B	11,02	1,52	5,20	8,75	24,91	1,45	1,02	0,59	0,66
TD C	10,89	1,39	6,82	11,95	24,74	1,48	1,07	0,74	0,65
TD	10,58	1,47	6,19	9,96	24,57	1,48	0,92	0,63	0,69

Anexo C – Dados experimentais dos experimentos de suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose e sacarose

Tabela C.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com o extrato de trigo contendo 5 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo						
(dias)	X (g/L) -A	X (g/L) -B	X (g/L) -C	S (g/L)- A	S (g/L)- A	S (g/L)- A
0	0,32	0,321	0,32	5,91	5,91	5,91
2	0,65	0,2411	0,64	5,09	5,66	5,01
4	1,58	1,82	1,724	2,92	1,99	4,24
6	2,05	1,93	2,254	2,58	1,87	1,86
8	3,64	3,09	3,454	0	0,60	0,09
10	3,56	3,16	3,494	0	0	0
12	3,25	3,51	2,80	0	0	0
ET5 A	$X = 0,0002t^5 - 0,007t^4 + 0,0679t^3 - 0,2223t^2 + 0,4471t + 0,305$					
ET5 B	$X = -5E-05t^5 + 0,0027t^4 - 0,0487t^3 + 0,3371t^2 - 0,4035t + 0,3941$					
ET5 C	$X = 0,0008t^4 - 0,0235t^3 + 0,2108t^2 - 0,1967t + 0,3363$					

Tabela C.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com extrato de trigo contendo 10 g/L de glicose, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo						
(dias)	X (g/L) -A	X (g/L) -B	X (g/L) -C	S (g/L)- A	S (g/L)- B	S (g/L)- C
0	0,88	0,88	0,88	12,60	12,60	12,60
2	1,13	1,71	0,91	11,75	9,20	8,68
4	2,83	1,30	3,03	9,11	9,00	9,23
6	4,96	5,88	3,38	8,19	9,72	5,90
8	7,28	5,45	4,69	2,54	3,39	4,32
10	7,38	7,32	4,81	0	0	0
12	6,68	6,61	6,68	0	0	0
ET10 A	$X = 0,0004t^5 - 0,0096t^4 + 0,0701t^3 - 0,037t^2 + 0,0109t + 0,8721$					
ET10 B	$X = 0,0003t^5 - 0,0097t^4 + 0,0924t^3 - 0,27t^2 + 0,5246t + 0,9565$					
ET10 C	$X = -1E-05t^5 + 0,0004t^4 - 0,0115t^3 + 0,1572t^2 - 0,1796t + 0,8534$					

Tabela C.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com extrato de trigo contendo 15 g/L de glicose, no intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) -A	X (g/L) -B	S (g/L)- A	S (g/L)- B
0	0,73	0,73	15,30	15,30
2	1,21	1,13	12,71	13,19
4	2,51	2,31	10,30	10,44
6	4,34	4,23	8,31	9,43
8	5,05	4,67	8,33	8,76
10	6,46	6,60	6,33	4,17
12	6,82	7,13	5,08	3,40
ET15 A $X = -0,0001t^5 + 0,0044t^4 - 0,0565t^3 + 0,3404t^2 - 0,2361t + 0,7902$				
ET15 B $X = 3E-05t^5 - 0,0006t^4 - 0,0067t^3 + 0,1572t^2 - 0,0502t + 0,7339$				

Tabela C.4 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento com extrato de trigo contendo 20 g/L de glicose (meio TD), no intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) -A	X (g/L) -A	X (g/L) -A	S (g/L)- A	S (g/L)- A	S (g/L)- A
0	1,44	1,44	1,44	24,79	24,79	24,79
2	2,05	1,85	2,23		23,09	
4	8,51	8,22	8,22	16,96	19,32	
6	8,56	9,95	9,85	15,34	13,57	16,25
8	9,01	9,07	10,72	19,17	17,22	15,89
10	9,92	10,98	9,16	12,01	9,05	10,67
12	10,38	9,38	9,23	10,18	9,65	9,13
ET20 A $X = 6E-05t^6 - 0,0031t^5 + 0,0586t^4 - 0,524t^3 + 2,0679t^2 - 1,4055t + 1,5038$						
ET20 B $X = -0,0004t^5 + 0,0146t^4 - 0,2135t^3 + 1,2139t^2 - 0,8875t + 1,5172$						
ET20 C $X = -0,0003t^5 + 0,0132t^4 - 0,1902t^3 + 1,0485t^2 - 0,4494t + 1,392$						

Tabela C.5 $X_{m\acute{a}x}$, X_0 , S_f , $S_{Xm\acute{a}x}$, S_i , $P_{Xm\acute{a}x}$, P_X , $Y_{x/s}$ e $\mu_{Xm\acute{a}x}$ para os experimentos de suplementação do extrato de trigo com diferentes concentrações de glicose.

EXP	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	X_0 (g.L ⁻¹)	S_f (g.L ⁻¹)	$S_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	S_i (g.L ⁻¹)	$P_{Xm\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	$\mu_{Xm\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)
5 A	3,70	0,31	0	0	5,93	0,38	0,34	0,57	0,32
5 B	3,40	0,39	0	0	5,96	0,39	0,25	0,50	0,79
5 C	3,59	0,34	0	0	5,69	0,39	0,31	0,57	0,66
ET 5	3,62	0,35	0	0	5,86	0,39	0,30	0,55	0,59
10 A	7,64	0,87	0	0,55	12,42	0,78	0,68	0,57	0,45
10 B	6,73	0,96	0	0,35	10,85	0,63	0,56	0,55	0,29
10 C	6,36	0,85	0	0	10,96	0,51	0,46	0,50	0,34
ET10	6,91	0,89	0	0,30	11,41	0,64	0,53	0,54	0,36
15 A	6,84	0,79	5,07	5,24	15,29	0,56	0,51	0,60	0,45
15 B	7,07	0,74	3,53	3,53	14,57	0,61	0,53	0,56	0,40
ET 15	7,00	0,77	4,3	2,92	15,02	0,59	0,52	0,58	0,43
20 A	9,82	1,50	6,56	9,23	24,07	1,51	0,67	0,56	0,83
20 B	11,04	1,52	5,20	5,20	24,91	1,45	0,68	0,48	0,66
20 C	10,90	1,39	6,82	7,73	24,74	1,48	1,07	0,56	0,65
ET 20 (TD)	10,59	1,47	6,19	7,39	24,57	1,48	0,81	0,53	0,69

Anexo D – Dados experimentais do experimento para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos

Tabela D.1 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 1, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo				
(dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0			33,61	33,61
2	0,86	0,88	44,13	39,30
4	1,56	1,99	37,14	26,88
6	5,81	5,86	17,74	37,31
8	10,13	10,13	36,67	29,37
10	10,64	10,80	21,46	13,44
13	9,42	11,31	16,44	17,16
1A	$X = 0,0003t^5 - 0,0075t^4 + 0,0498t^3 + 0,1089t^2 - 0,1539t + 0,4066$			
1B	$X = 0,0005t^5 - 0,0137t^4 + 0,1098t^3 - 0,0828t^2 - 0,142t + 0,4286$			

Tabela D.2 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 2, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo				
(dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0			21,79	21,79
2	0,73	0,98	20,50	15,24
4	1,70	1,79	25,16	19,03
6	3,54	3,54	12,14	20,63
8	6,14	4,11	11,75	18,96
10	10,24	8,90	0,00	0,06
13	11,49	8,07	0,00	0,00
2A	$X = -0,0015t^4 + 0,0254t^3 - 0,0025t^2 - 0,0349t + 0,5906$			
2B	$X = -0,0014t^4 + 0,0264t^3 - 0,0434t^2 + 0,0279t + 1,0254$			

Tabela D.3 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 3, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0	2,49	2,49	34,03	34,03
2	2,57	3,27	32,38	34,03
4	2,35	2,95	34,10	40,15
6	2,01	2,57	29,69	38,43
8	3,18	3,40	34,26	29,69
11	18,90	21,16	16,25	23,78
13	23,97	21,80	23,42	13,60
3A	$X = -0,0045t^4 + 0,1027t^3 - 0,5316t^2 + 0,8498t + 2,5049$			
3B	$X = -0,0009t^5 + 0,0234t^4 - 0,1731t^3 + 0,4345t^2 - 0,1108t + 2,4815$			

Tabela D.4 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 4, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,94	1,94	22,49	22,49
2	1,30	2,01	29,71	24,11
4	1,78	1,99	17,70	28,81
6	2,36	2,23	20,23	18,61
8	9,01	6,60	11,98	20,70
11	12,43	14,99	11,05	0,00
13	13,25	16,72	0,00	0,00
4A	$X = -0,0022t^4 + 0,0433t^3 - 0,1341t^2 + 0,1499t + 1,6032$			
4B	$X = -0,0003t^5 + 0,0069t^4 - 0,0239t^3 - 0,032t^2 + 0,2473t + 1,8674$			

Tabela D.5 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 5, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,37	1,37	37,97	37,97
2	1,03	1,05	38,73	40,34
4	1,44	1,34	34,92	36,90
6	3,34	2,94	35,38	35,68
8	3,97	5,17	35,64	32,21
11	5,82	6,24	25,07	28,92
13	7,51	4,55	13,03	13,03
5A	$X = 8E-05t^5 - 0,0025t^4 + 0,0232t^3 - 0,0274t^2 + 0,0135t + 1,2803$			
5B	$X = 0,0002t^5 - 0,0075t^4 + 0,0784t^3 - 0,2297t^2 + 0,2091t + 1,1824$			

Tabela D.6 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 6, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S (g/L) - A	S (g/L) - B
0	0,85	0,85	20,73	20,73
2	0,86	0,76	21,80	20,20
4	1,50	2,02	19,51	17,07
6	2,66	3,41	18,60	12,42
8	3,93	4,46	12,94	12,94
11	4,67	4,64	11,57	11,34
13	4,95	4,95	10,11	8,41
6A	$X = 1E-04t^5 - 0,0031t^4 + 0,0256t^3 - 0,0032t^2 - 0,0661t + 0,8494$			
6B	$X = 0,0001t^5 - 0,0028t^4 + 0,0146t^3 + 0,0685t^2 - 0,0288t + 0,6557$			

Tabela D.7 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 7, para o intervalo de 0 a 14 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,57	1,57	36,02	36,02
3	1,27	1,79		
5	1,60	1,84	31,31	32,40
7	4,15	4,04	30,54	30,73
10	7,30	8,72	18,13	19,98
12	6,00	8,04	9,93	16,04
14	5,17	5,64	7,76	10,31
7A	$X = 0,0002t^5 - 0,0065t^4 + 0,0736t^3 - 0,2287t^2 + 0,271t + 0,9518$			
7B	$X = 0,0002t^5 - 0,0088t^4 + 0,1039t^3 - 0,3756t^2 + 0,4942t + 1,4317$			

Tabela D.8 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 8, para o intervalo de 0 a 14 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,23	1,23	15,77	15,77
3	1,26	1,32	15,04	15,32
5	1,94	2,31	15,38	17,51
7	3,06	2,46	13,71	15,58
10	7,01	7,87	5,56	6,56
12	1,39	6,35	0,00	3,47
14	7,54	7,08	0,00	2,54
8A	$X = -0,0005t^4 + 0,0069t^3 + 0,0461t^2 - 0,1297t + 1,2213$			
8B	$X = -0,0005t^4 + 0,006t^3 + 0,053t^2 - 0,1387t + 1,1996$			

Tabela D.9 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 9, para o intervalo de 0 a 10 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,13	1,13	35,18	35,18
3	3,38	2,38	34,81	32,89
5	9,82	16,14	24,60	15,12
7	17,87	20,07	15,86	13,05
10	24,02		9,12	
9A	$X = -0,0043t^4 + 0,0232t^3 + 0,5207t^2 - 0,9041t + 1,13$			
9B	$X = 0,0054t^5 - 0,1065t^4 + 0,6016t^3 - 0,5159t^2 + 0,3907t + 1,0159$			

Tabela D.10 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 10, para o intervalo de 0 a 10 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	0,62	0,62	21,98	21,98
2	0,97	1,46	21,95	21,35
4	4,95	3,01	21,35	15,78
5	5,42	5,42	17,84	8,84
7	12,13	12,53	0,28	0,28
10	10,72	13,47	0,00	0,00
10 A	$X = 0,001t^4 - 0,0581t^3 + 0,6993t^2 - 1,0183t + 1,1003$			
10 B	$X = 0,0025t^5 - 0,069t^4 + 0,6201t^3 - 1,9417t^2 + 2,5069t + 0,4424$			

Tabela D.11 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 11, para o intervalo de 0 a 14 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	35,77	35,77	1,86	1,86
2	34,00	7,28	1,59	1,64
5	32,07	35,40	2,44	2,27
7	32,81	34,00	4,82	6,70
9	22,40	16,58	11,04	18,33
13	15,56	11,96	25,31	24,18
14	12,23	10,01	26,32	29,65
11 A	$X = -0,0004t^5 + 0,0102t^4 - 0,0674t^3 + 0,2361t^2 - 0,3449t + 1,8337$			
11 B	$X = -0,0034t^4 + 0,0701t^3 - 0,1873t^2 + 0,0991t + 1,6865$			

Tabela D.12 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 12, para o intervalo de 0 a 14 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	17,86	17,86	1,48	1,48
2	15,49	9,05	1,27	1,31
5	10,31	12,90	2,04	2,68
7	15,12	10,83	6,71	6,42
9	4,77	7,25	14,82	12,67
12	0,00	0,00	15,73	15,63
14	0,00	0,00	13,16	16,21
12 A	$X = 0,0003t^5 - 0,0127t^4 + 0,1535t^3 - 0,5264t^2 + 0,5591t + 1,3051$			
12 B	$X = 0,0005t^5 - 0,0174t^4 + 0,205t^3 - 0,7292t^2 + 0,841t + 1,1308$			

Tabela D.13 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 13, para o intervalo de 0 a 8 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,71	1,71	32,00	32,00
2	2,00	1,64	37,41	17,19
5	9,51	8,01	14,40	19,35
8	17,76	17,60	15,65	16,30
13 A	$X = -0,0226t^4 + 0,2852t^3 - 0,6432t^2 + 0,4714t + 1,7093$			
13 B	$X = -0,0128t^4 + 0,165t^3 - 0,2506t^2 - 0,0108t + 1,7093$			

Tabela D.14 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 14, para o intervalo de 0 a 9 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,24	1,24	17,67	17,67
2	1,44	1,19	14,96	9,20
5	7,76	9,10	7,13	8,43
9	12,10	13,62	0,00	2,25
14 A	$X = 0,0033t^5 - 0,0739t^4 + 0,5232t^3 - 1,0525t^2 + 0,7287t + 1,1518$ $S = 0,0413t^3 - 0,539t^2 - 0,4454t + 17,673$			
14 B	$X = 0,0033t^5 - 0,0745t^4 + 0,5097t^3 - 0,8816t^2 + 0,4614t + 1,213$ $S = 0,0404t^3 - 0,5313t^2 - 0,2092t + 17,7$			

Tabela D.15 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 15, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	2,06	2,06	36,13	36,13
2	1,20	1,49	26,48	22,12
5	15,84	8,73	23,08	25,20
7	16,82	20,50	17,64	17,81
9	20,44	15,18	11,52	3,88
11	18,66	17,34	5,98	8,80
13	16,53	17,70	0,71	4,93
15 A	$X = -0,0007t^5 + 0,0265t^4 - 0,3842t^3 + 2,2122t^2 - 1,9835t + 2,2948$			
15 B	$X = 7E-05t^5 + 0,0016t^4 - 0,0998t^3 + 1,0914t^2 - 1,7102t + 2,1832$			

Tabela D.16 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 16, para o intervalo de 0 a 13 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	1,61	1,61	19,15	19,15
2	1,18	1,15	17,67	16,07
5	7,45	7,02	13,48	11,24
7	11,89	12,06	5,60	4,03
9	14,01	12,71	0,43	0,85
11	10,81	12,38	5,24	0,32
13	11,82	11,93	0,43	0,48
16 A	$X = 0,0002t^5 - 0,0044t^4 + 0,0042t^3 + 0,3509t^2 - 0,377t + 1,6193$			
16 B	$X = 0,0002t^5 - 0,0044t^4 + 0,0042t^3 + 0,3509t^2 - 0,377t + 1,6193$			

Tabela D.17 Variação da concentração de biomassa (X) e glicose (S) em função do tempo de cultivo para o experimento 17, para o intervalo de 0 a 12 dias.

Tempo (dias)	X (g/L) - A	X (g/L) - B	S(g/L) - A	S (g/L) - B
0	0,65	0,65	32,22	32,22
2	0,77		24,85	25,72
4	1,87	1,48	24,41	18,42
6	0,96	0,59	25,28	24,20
8	2,21		23,32	20,85
10	1,79	1,69	27,96	15,39
12	1,90	1,62	26,01	20,11
17 A	$X = -0,0001t^5 + 0,004t^4 - 0,0484t^3 + 0,2231t^2 - 0,0572t + 0,6298$			
17 B	$X = -9E-05t^5 + 0,0031t^4 - 0,0381t^3 + 0,1777t^2 - 0,0757t + 0,6092$			

Tabela D.18 Parâmetros cinéticos obtidos das curvas ajustadas aos dados experimentais dos experimentos para definição do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos

EXP	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{Xm\acute{a}x}$	P_X	$Y_{X/S}$	$\mu_{Xm\acute{a}x}$	PS	PSX	P_{PS}	$Y_{PS/S}$
1A	11,44	1,16	1,00	0,38	0,79	209,94	18,335	16,15	7,19
1B	11,15	1,16	1,04	0,45	0,94	235,23	20,58	18,09	8,92
2A	11,88	0,97	0,92	0,54	0,47	259,84	22,342	19,99	12,46
2B	10,86	0,82	0,79	0,48	0,33	222,52	20,68	17,12	11,01
3A	21,70	4,54	1,49	0,89	0,35	102,31	4,717	7,87	4,75
3B	22,45	1,60	1,59	0,79	0,41	104,48	4,717	8,04	3,85
4A	13,47	1,00	0,97	0,58	0,32	140,95	10,566	10,84	6,14
4B	17,12	1,23	1,20	0,67	0,35	179,31	10,566	13,79	7,86
5A	7,63	0,49	0,49	0,25	0,22	55,00	7,208	4,23	2,20
5B	6,38	0,50	0,45	0,40	0,32	35,72	5,608	2,75	1,38
6A	4,94	0,40	0,34	0,41	0,32	137,62	27,803	10,59	12,71
6B	4,99	0,48	0,41	0,48	0,38	126,49	24,705	9,73	10,23
7A	7,82	0,61	0,55	0,25	0,35	61,76	7,99	4,41	2,21
7B	9,45	0,70	0,61	0,34	0,31	77,40	8,139	5,53	3,00
8A	7,72	0,53	0,50	0,40	0,26	5,41	0,72	0,39	0,34
8B	8,05	0,54	0,52	0,43	0,26	9,48	1,192	0,68	0,61
9A	24,16	2,54	2,38	0,88	0,85	160,93	6,7	16,09	6,01
9B	20,49	3,01	2,78	0,87	0,85	159,82	7,8	22,83	7,17
10A	12,98	1,39	1,25	0,53	0,78	165,89	12,88	16,59	7,45
10B	14,15	1,70	1,58	0,62	0,59	234,02	16,8	23,40	10,66

EXP	X_{máx} (g.L⁻¹)	P_{Xmáx} (g.L⁻¹.dia⁻¹)	P_X (g.L⁻¹.dia⁻¹)	Y_{X/S} (g.g⁻¹)	μ_{Xmáx} (dia⁻¹)	PS (mg.L⁻¹)	PSX (mg.g⁻¹)	P_{PS} (mg.L⁻¹.dia⁻¹)	Y_{PS/S} (mg.g⁻¹)
11A	26,56	1,85	1,81	1,02	0,38	180,03	6,835	12,86	7,49
11B	29,64	2,14	2,05	0,97	0,43	296,27	10,05	21,16	10,29
12A	16,19	1,26	1,14	0,82	0,47	172,34	10,731	12,31	9,50
12B	16,33	1,34	1,21	0,85	0,52	144,07	8,866	10,29	8,07
13A	17,95	2,19	2,11	0,57	0,59	64,49	3,631	8,06	2,25
13B	17,60	1,99	1,99	1,01	0,56	111,44	6,332	13,93	7,10
14A	12,03	1,54	1,39	0,65	0,66	94,82	7,747	10,54	5,37
14B	13,63	1,76	1,59	0,84	0,70	111,81	8,12	12,42	7,24
15A	18,55	2,37	1,40	0,53	0,76	139,11	7,61	10,70	3,86
15B	17,80	1,77	1,47	0,55	0,64	116,72	6,51	8,98	4,03
16A	14,31	1,40	1,19	0,67	0,45	236,18	16,47	18,17	12,49
16B	13,09	1,27	1,08	0,59	0,43	101,69	7,804	7,82	5,29
17A	2,24	0,29	0,14	0,20	0,37	22,09	9,95	1,84	2,85
17B	1,69	0,20	0,10	0,09	0,31	16,53	9,96	1,38	1,39

Anexo E – Dados experimentais do experimento para avaliação do meio de cultivo selecionado em escala ampliada utilizando dois diferentes valores de $K_L a$ inicial

Tabela E.1 Variação da concentração de biomassa (X), glicose (S), exopolissacarídeos (E) e pressão parcial de oxigênio dissolvido ($pO_2\%$) em função do tempo de cultivo para o experimento com $K_L a$ inicial de $10,2\text{ h}^{-1}$, no intervalo de 0 a 6 dias.

Tempo (dias)	X (g/L)	E (g/L)	S(g/L)	pO_2 (%)
0	2,34	0,42	26,39	102,1
2	6,68	0,78	26,47	8,0
3	15,63	1,52	23,93	4,6
4,5	21,64	1,41	5,68	0
6	27,96	1,44	5,11	0

$$X = -0,2141t^3 + 2,058t^2 - 0,3841t + 2,1831$$

$$S = 0,1107t^4 - 0,9672t^3 + 1,1816t^2 + 0,2242t + 26,559$$

Tabela E.2 Variação da concentração de biomassa (X), glicose (S), exopolissacarídeos (E) e pressão parcial de oxigênio dissolvido ($pO_2\%$) em função do tempo de cultivo para o experimento com $K_L a$ inicial de $19,3\text{ h}^{-1}$, no intervalo de 0 a 10 dias.

Tempo (dias)	X (g/L)	E (g/L)	S(g/L)	pO_2 (%)
0	0,64	0,46	31,72	99,4
2	0,58	0,18	30,78	100,5
4	4,25	0,31	27,83	97,4
5	6,25	0,24	26,54	108,4
6	8,74	0,26	13,30	103,3
7	13,84	0,45	13,05	107,4
10	10,09	0,38	12,96	98,9

$$X = 0,0018t^5 - 0,05t^4 + 0,4092t^3 - 0,8799t^2 + 0,5389t + 0,6938$$

$$S = -0,0041t^5 + 0,1127t^4 - 1,0091t^3 + 3,0537t^2 - 3,1009t + 31,693$$

Anexo F– Exemplo dos cálculos realizados para obtenção da velocidade de produção de biomassa (dX/dt), da velocidade específica de produção de biomassa - μ_X (dX/Xdt), da velocidade máxima específica de produção de biomassa - $\mu_{Xmáx}$ ($\ln X$) e da produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$), a partir das curvas ajustadas para concentração de biomassa (X) e substrato (S).

Tabela F.1 Biomassa (X), derivada de X em função do tempo de cultivo (dX/dt), velocidade específica de crescimento - μ_X (dX/Xdt), velocidade específica de crescimento máxima - $\mu_{Xmáx}$ ($\ln X$) e produtividade máxima em biomassa ($P_{Xmáx}$) para o experimento com o meio POL A (Anexo B – Tabela B1).

t (dias)	X^1 (g/L)	dX/Xdt		$P_{Xmáx}$	
		dX/dt^2	(dia ⁻¹)	$\ln X$	(g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
0	0,720783	0,47994	0,665859	-0,32742	0
0,3	0,832273	0,272634	0,327578	-0,1836	0,371632
0,6	0,889612	0,118052	0,132701	-0,11697	0,281381
0,9	0,907761	0,010519	0,011588	-0,09677	0,207754
1,2	0,900015	-0,05539	-0,06155	-0,10534	0,14936
1,5	0,878077	-0,08487	-0,09665	-0,13002	0,104863
1,8	0,852132	-0,08285	-0,09723	-0,16001	0,072971
2,1	0,830918	-0,05403	-0,06502	-0,18522	0,052445
2,4	0,821804	-0,00285	-0,00346	-0,19625	0,042092
2,7	0,830861	0,066485	0,080019	-0,18529	0,04077
3	0,862935	0,150009	0,173836	-0,14742	0,047384
3,3	0,921722	0,244013	0,264736	-0,08151	0,060891
3,6	1,00984	0,34503	0,341668	0,009792	0,080294
3,9	1,128904	0,449836	0,398472	0,121247	0,104646
4,2	1,279599	0,555454	0,434085	0,246547	0,133051
4,5	1,461752	0,659151	0,450932	0,379636	0,16466
4,8	1,67441	0,758439	0,452959	0,515461	0,198672
5,1	1,915907	0,851077	0,444216	0,650191	0,234338
5,4	2,183944	0,935067	0,428155	0,781132	0,270956
5,7	2,475659	1,008657	0,40743	0,906506	0,307873
6	2,787699	1,07034	0,383951	1,025217	0,344486
6,3	3,116299	1,118855	0,359033	1,136646	0,380241
6,6	3,45735	1,153184	0,333546	1,240502	0,414631
6,9	3,806476	1,172557	0,308043	1,336704	0,447202
7,2	4,159105	1,176447	0,282861	1,4253	0,477545
7,5	4,510546	1,164573	0,258189	1,506418	0,505302

7,8	4,856058	1,136898	0,23412	1,580227	0,530163
8,1	5,190927	1,093633	0,210682	1,646912	0,55187
8,4	5,51054	1,03523	0,187864	1,706663	0,570209
8,7	5,810455	0,96239	0,165631	1,759659	0,58502
9	6,086478	0,876057	0,143935	1,80607	0,596188
9,3	6,334734	0,77742	0,122723	1,846048	0,603651
9,6	6,551742	0,667915	0,101945	1,879731	0,607392
9,9	6,734489	0,549221	0,081553	1,907242	0,607445
10,2	6,880501	0,423263	0,061516	1,928692	0,603894
10,5	6,987921	0,292212	0,041817	1,944183	0,59687
10,8	7,055579	0,158482	0,022462	1,953819	0,586555
11,1	7,083063	0,024735	0,003492	1,957706	0,573178
11,155	7,083764	0,000438	6,18E-05	1,957805	0,570415
11,4	7,070802	-0,10612	-0,01501	1,955974	0,557019
11,7	7,020128	-0,23095	-0,0329	1,948781	0,538406
12	6,933358	-0,34633	-0,04995	1,936344	0,517715

¹. Valores de X obtidos com o polinômio ajustado descrito na Figura E.1

². Derivada do polinômio ajustado descrito na Figura E.1 – $dX/dt=0,001261x^4-0,037296x^3+0,32568x^2-0,7854x+0,47994$

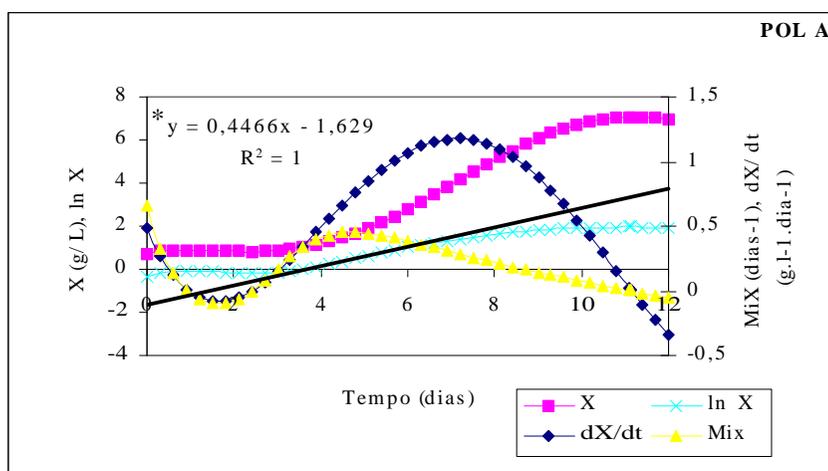


Figura F.1 Concentração de biomassa (X), logaritmo neperiano da concentração de biomassa (ln X), velocidade de produção de biomassa (dX/dt) e velocidade específica de produção de biomassa (μX) em função do tempo de cultivo (t) para o experimento POL A. *O coeficiente angular da linha de tendência linear obtida para a curva de lnX em função do tempo é igual à velocidade específica de produção de biomassa máxima ($\mu_{X_{\text{máx}}}$).

Anexo G – Exemplo da análise estatística realizada nos experimentos para determinação do meio de cultivo e nos experimentos para determinação da fonte de carbono e sua concentração

Tabela G.1 Replicatas das produtividades máximas ($P_{x\text{máx}}$) em biomassa obtidas nos experimentos utilizando os meios de cultivo POL, TD e POL-MIL

Meio de cultivo		$P_{x\text{máx}}$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)		
		POL	POL-MIL	TD
Replicatas				
A		0,61	1,14	1,51
B		0,65	1,18	1,44
C		0,63	1,16	1,48

Tabela G.2 Teste estatístico ANOVA para os dados apresentados na Tabela G.1

Anova: fator único

Interação entre os meios POL e POL-MIL

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
POL	3	1,89	0,63	0,0004
POL-MIL	3	3,48	1,16	0,0004

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,42135	1	0,42135	1053,375	5,37E-06	7,70865
Dentro dos grupos	0,0016	4	0,0004			
Total	0,42295	5				

Anova: fator único**Interação entre os meios POL-MIL e TD**

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
POL-MIL	3	3,48	1,16	0,0004
TD	3	4,43	1,476667	0,001233

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,150417	1	0,150417	184,1837	0,000171	7,70865
Dentro dos grupos	0,003267	4	0,000817			
Total	0,153683	5				

Anova: fator único**Interação entre os meios POL e TD**

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
POL	3	1,89	0,63	0,0004
TD	3	4,43	1,476667	0,001233

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,075267	1	1,075267	1316,653	3,44E-06	7,70865
Dentro dos grupos	0,003267	4	0,000817			
Total	1,078533	5				

Anexo H – Leituras de absorvância dos microrganismos teste em diferentes meios e cultivo

Tabela H.1 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de *E. coli* cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e EP e meio contendo o caldo de cultivo CC.

controle	EI	controle	CC	controle	EP
0,677	0,739	0,677	0,027	0,622	0,552
0,650	0,735	0,650	0,037	0,598	0,520
0,670	0,775	0,670	0,044	0,617	0,534
0,692	0,702	0,692	0,024		

Tabela H.2 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de *B. subtilis* cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e meio contendo o caldo de cultivo CC.

controle	EI	controle	CC
0,525	0,366	0,525	0,506
0,469	0,349	0,469	0,357
0,474	0,244	0,474	0,305
0,502	0,380	0,502	0,396

Tabela H.3 Leituras de absorvância a 540 nm de suspensões de células de *C. albicans* cultivada em meio controle, meio contendo extrato EI e EP e meio contendo o caldo de cultivo CC.

controle	EI	controle	CC	controle	EP
0,580	0,371	0,580	0,644	0,456	0,335
0,579	0,247	0,579	0,571	0,533	0,345
0,485	0,186	0,485	0,532	0,533	0,304
0,759	0,218	0,759	0,469		

Anexo I – Composição da água de maceração de milho e do extrato de levedura, da indústria Refinações de Milho Brasil Ltda., de acordo com HOCH (1997).

Principais constituintes	% em base seca
Cinzas (óxidos)	17,0
Proteína bruta	47,0
Gordura	0,4
Ácido láctico	26,0
Nitrogênio	7,5
Ácidos graxos	7,8
Açúcares redutores	2,5