



**Escola Superior  
Agrária**

Politécnico de Coimbra

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA

**MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR**

Bibiana Carolina da Silva Cunha

# **Valorização de Resíduos da Produção Intensiva de Cogumelos para a Produção de Biopolímero**

**Orientador:** Professora Marta Henriques

**Coorientador:** Engenheira Ana Carolas

Coimbra, dezembro de 2020

Bibiana Carolina da Silva Cunha

# **Valorização de Resíduos da Produção Intensiva Cogumelos para a Produção de Biopolímero**

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar.

**Orientador:** Professora Marta Henriques

**Coorientador:** Engenheira Ana Carolas

Coimbra, dezembro de 2020

## **Agradecimentos**

Com a finalização deste relatório de estágio termina também mais uma fase da minha vida académica. Mais uma meta pessoal e profissional que foi alcançada e que não teria sido possível sem a ajuda, incentivo e companheirismo de muitas pessoas.

Começo por agradecer à Biotrend, S.A. e em especial ao Doutor Bruno Ferreira pela oportunidade de poder realizar este estágio na empresa e em contexto de trabalho.

Agradeço à Engenheira Ana Carolas pelos ensinamentos e sobretudo pela paciência em responder às milhentas perguntas e dúvidas.

À Doutora Catarina Meireles que foi a primeira pessoa a sugerir este projeto para o meu relatório de estágio e a incentivar-me a fazê-lo. Agradeço, não só por tudo o que me ensinou, mas por muitas vezes ter feito questão que eu aprendesse mais e melhor.

À Doutora Marina Pires por estar sempre disponível e pronta a ajudar e ensinar.

Aos restantes membros da Biotrend pelo companheirismo e pelas gargalhadas.

À Professora Marta Henriques por todo o apoio e apreciação crítica ao longo da realização deste trabalho.

E por fim, quero agradecer aos restantes elementos do “quarteto fantástico”, Ana Gaspar, Cristina Cipriano e Leticia Gameiro por toda a ajuda, companheirismo e sobretudo por estarem lá quando eu não pude estar. Trabalhar, cuidar da casa, tirar um mestrado e organizar um casamento não foi fácil, mas teria sido impossível sem elas.

## Resumo

O presente relatório foi realizado no âmbito do estágio profissionalizante para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), pertencente ao Instituto Politécnico de Coimbra.

O principal objetivo do estágio foi a otimização de um bioprocessos para produção de poli-hidróxibutirato (PHB) utilizando resíduos da indústria de produção de cogumelos e, com isso, adquirir competências práticas no desenvolvimento e otimização de bioprocessos.

Para isso foram realizados ensaios a várias escalas, nomeadamente em frascos agitados e em bio-reatores controlados em regime de *fed-batch*. Foi testada a capacidade de crescimento e produção de PHB do microrganismo *Paraburkholderia sacchari* em meios contendo como fonte de carbono hidrolisados ou extratos obtidos a partir de resíduos de cogumelo.

Concluiu-se que para ambas as matérias primas testadas, foi possível produzir PHB embora em concentrações baixas. Para além da concentração total de açúcares dos hidrolisados testados ser bastante baixa, também a existência de componentes inibidores do crescimento contribuiu para produções limitadas tanto de biomassa como de PHB. No que diz respeito ao extracto de cogumelo rico em manitol, o processo de extração da fonte de carbono da matéria prima mostrou-se bastante demorado e com baixo rendimento, indicando que este processo poderá ser ainda optimizado, usando métodos mais eficientes. Apesar dessa limitação, concluiu-se que o extracto de cogumelo rico em manitol constitui uma fonte de carbono mais vantajosa que o hidrolisado de cogumelo, permitindo obter produções mais satisfatórias de biomassa e PHB.

## Abstract

This report was carried out as part of the professional internship to obtain a Master's degree in Food Engineering at the Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), belonging to the Polytechnic Institute of Coimbra.

The main objective of the internship was to optimize a bioprocess for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) using residues from the mushroom production industry and thereby acquire practical skills in the development and optimization of bioprocesses.

For this, tests were carried out at various scales, namely in shaking flasks and in bioreactors controlled in a *fed-batch* regime. The growth and PHB production capacity of the microorganism *Paraburkholderia sacchari* was tested in media containing hydrolyzates or extracts obtained from mushrooms residues as a carbon source.

It was concluded that for both tested raw materials, it was possible to produce PHB even though in low concentrations. In addition to the total sugar concentration of the hydrolyzates tested being quite low, the existence of growth inhibitory components also contributed to limited production of both biomass and PHB. Regarding the mushrooms extract rich in mannitol, the process of extracting the carbon source from the raw material proved to be quite time consuming and with low yield, suggesting that this process could be further optimized using more efficient methods. Despite this limitation, it was concluded that the mannito-rich mushrooms extract constitutes a more advantageous carbon source than the mushrooms hydrolyzate, allowing to obtain more satisfactory productions of biomass and PHB.

## Índice

1. Introdução.....	6
2. Revisão bibliográfica .....	7
2.1. Poli-hidroxialcanoatos (PHA) .....	7
2.2. Resíduos de cogumelos na indústria alimentar .....	9
2.3. Funguschain Project.....	10
2.4. Entidade de acolhimento – Biotrend .....	11
2.5. Objetivos do estágio profissionalizante .....	12
3. Trabalho experimental.....	13
3.1. Ensaios à escala laboratorial.....	13
3.1.1. Ensaio com hidrolisado de cogumelos.....	13
3.1.2. Ensaio com o extrato de pó de cogumelo.....	15
3.2. Ensaios à escala piloto em Biorreactor .....	17
3.2.1. Características dos biorreactores.....	17
3.2.2. Condições dos ensaios em biorreactor .....	18
3.3. Métodos analíticos.....	20
3.3.1. Medição de densidade ótica .....	20
3.3.2. Determinação do peso seco celular.....	20
3.3.3. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos.....	21
3.3.4. Determinação de sais inorgânicos .....	22
3.3.5. Quantificação de PHB.....	23
3.3.6. Medição de pH .....	24
3.3.7. Massa específica.....	24
4. Apresentação de resultados e discussão .....	25
4.1. Ensaios laboratoriais com hidrolisado .....	25
4.2. Ensaios laboratoriais com extrato de pó de cogumelo .....	28
4.3. Ensaios em Biorreactor .....	31
5. Conclusões .....	38
Referências bibliográficas.....	41
Anexos.....	43
Anexo I -Soluções para determinação de sais .....	43

Anexo II -Curvas de calibração de sais inorgânicos .....	43
Anexo III -Curvas de calibração para o PHB (ácido crotónico).....	45
Anexo IV -Registo das densidades óticas obtidas a 600 nm no ensaio de crescimento com hidrolisado de cogumelo.....	46
Anexo V -Registo das densidades óticas obtidas a 600 nm no ensaio de crescimento com extrato de pó de cogumelo .....	46
Anexo VI -Registo da concentração de sais, peso seco, PHB ao longo do ensaio em bioreator .....	47
Anexo VII -Outras Soluções .....	48

## 1. Introdução

Atualmente a utilização de plásticos é um problema a nível mundial, pois a sua degradação de forma natural é um processo bastante lento, por vezes superior a 500 anos. Apenas uma percentagem dos plásticos produzidos, são recicláveis e por isso a acumulação de plásticos no meio ambiente está a afetar a fauna e flora. Para além disso a produção de plásticos tem como base a utilização de petróleo, ou seja, matérias-primas não renováveis (WWF, 2018).

Um das soluções para este uso excessivo de plásticos é utilizar materiais alternativos, como bioplásticos produzidos a partir de matérias primas renováveis. Estes são produzidos por via microbiana e apresentam características semelhantes aos plásticos de origem fóssil. Alguns podem ainda ser biodegradáveis, como é o caso dos poli-hidroxicarboxilatos, permitindo reduzir o impacto negativo no meio ambiente, quando chegam ao fim de vida. No entanto, a produção de bioplásticos ainda é um processo dispendioso, dificultando uma produção mais generalizada por esta via. De forma a reduzir os custos de produção, muita investigação tem sido realizada nomeadamente no uso de fontes de carbono alternativas.

De forma a produzir bioplásticos, os microrganismos necessitam de fontes de nutrientes, como fontes de carbono, azoto e fósforo. Para que o processo de produção de bioplásticos não seja tão dispendioso e, numa perspectiva de economia circular, podem ser utilizadas matérias-primas naturais provenientes de outras indústrias, que constituem correntes secundárias desses processos. Ao invés de serem eliminados esses sub-produtos poderão ser valorizados, utilizando-os como matéria-prima para produção de bioplásticos.



## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Poli-hidroxicanoatos (PHA)

Hoje em dia, é difícil imaginar a sociedade sem plástico. Devido às suas características de durabilidade e versatilidade é utilizado numa grande variedade de produtos e nas mais variadas áreas, desde a medicina, atividades industriais ou acondicionamento de alimentos (Lima, 2014).

O plástico que se usa atualmente no nosso dia-a-dia tem majoritariamente origem petroquímica e a sua utilização em massa começou há cerca de 70 anos. O que inicialmente foi visto como grandes vantagens na sua utilização; nomeadamente grande resistência, durabilidade e baixo custo; são hoje vistos como aspetos preocupantes em termos ambientais. Praticamente todo o plástico criado no planeta até à atualidade, ainda existe de alguma forma, isto porque muitos dos plásticos que usamos diariamente podem demorar até 500 anos a biodegradar-se (Figura 1) (WWF, 2018).



Figura 1- Ciclo de vida de alguns plásticos (WWF, 2018)

Estas características têm levantado várias questões ambientais, e por isso tem surgido a necessidade de criar polímeros alternativos biodegradáveis, tais como os poli-hidroxicanoatos.

Os poli-hidroxicanoatos (PHA's) são bioplásticos biodegradáveis, e constituem ótimas alternativas aos plásticos derivados do petróleo. Contudo, os custos de produção destes bioplásticos são ainda pouco competitivos quando comparados com os seus concorrentes convencionais (Cesário et al., 2014).

A sua produção é feita com o recurso apenas a matérias primas renováveis. É naturalmente produzido por muitas bactérias diferentes e acumulado como reserva de carbono e energia no meio intracelular (Figura 2), normalmente quando há limitação de algum nutriente como o azoto ou fósforo. Algumas bactérias podem acumular entre 70 a 90 % do seu peso seco em PHA. Este bioplástico torna-se especialmente interessante por ser um produto químico puro, com características termoplásticas, elásticas, não tóxicas, biodegradáveis e biocompatíveis (Da Silva et al., 2007; Johnson et al., 2009).

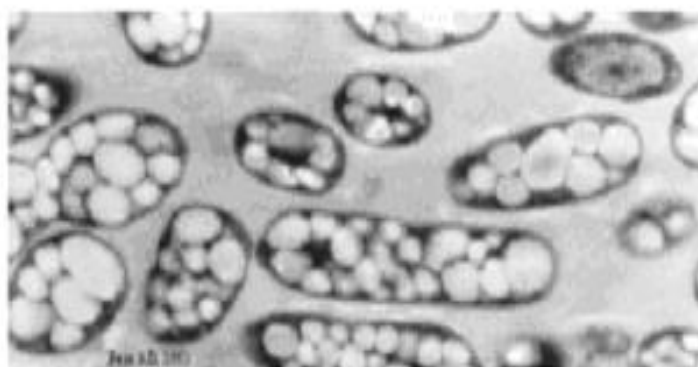
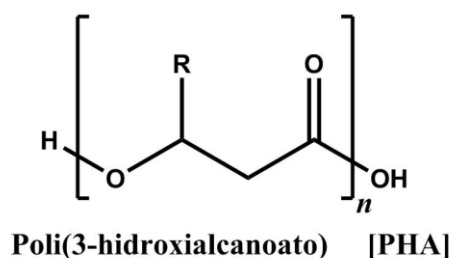


Figura 2- Células bacterianas contendo grânulos de PHA no seu interior (Da Silva et al., 2007)

Os PHA's podem ser classificados em dois tipos, conforme o número de carbonos da cadeia lateral dos seus monómeros. Podem ser de cadeia curta (3 a 5 carbonos) ou cadeia média (6 a 16 carbonos). O tamanho do grupo R que se vai ligar à cadeia principal vai definir vários tipos de PHA's (Figura 3) com diferentes propriedades termo-mecânicas. O polihidroxibutirato (PHB) é o homopolímero de PHA mais estudado e mais abundante e caracteriza-se por ter um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) como radical. (Figueiredo et al., 2014; Johnson et al., 2009).



<b>R=CH<sub>3</sub></b>	<b>Poli(3-hidroxi-butirato)</b>	<b>[PHB]</b>
<b>R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>	<b>Poli(3-hidroxi-valerato)</b>	<b>[PHV]</b>
<b>R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>	<b>Poli(3-hidroxi-hexanoato)</b>	<b>[PHHex]</b>
<b>R=(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub></b>	<b>Poli(3-hidroxi-octanoato)</b>	<b>[PHO]</b>

Figura 3 - Estrutura geral de PHA's e exemplos de outras estruturas derivadas

(Adaptado-(Shrivastav et al., 2013))

## 2.2. Resíduos de cogumelos na indústria alimentar

Na natureza existem inúmeras espécies de cogumelos comestíveis. Cada uma delas com benefícios para a saúde humana, podendo até prevenir doenças graves (Stuppiello, 2016). Sendo um alimento saudável, com baixo teor de gorduras, rico em proteínas, vitaminas e sais minerais, a sua produção tem vindo a aumentar nos últimos anos.

Na Europa, a produção de cogumelos é um negócio com muito relevo e, mais de 1 milhão de toneladas são produzidas por ano. No entanto, nem toda a produção é aproveitada havendo muito desperdício. Cerca de 60 000 ton de desperdício de cogumelos são semanalmente descartados, tratadas como um subproduto de baixo valor sendo na sua maioria consideradas resíduos que são colocados em aterros (Bio-based Industries Joint Undertaking, 2019; Funguschain Project, 2017).

Torna-se assim importante criar produtos e desenvolver processos inovadores que transformem a indústria dos cogumelos num formato de economia circular garantindo que os seus desperdícios se tornem produtos de alto valor acrescentado para outros setores de atividade. Os outrora considerados desperdícios poderão então ser incorporados como matérias-primas para a produção de produtos com interesse comercial.

### 2.3. Funguschain Project

Todos os anos, na Europa, são gerados mais de 3 milhões de toneladas de resíduos de cogumelos que são subaproveitados. O projeto Funguschain, financiado pela *Bio Based Industries Joint Undertaking* no contexto do programa de desenvolvimento e inovação da Comissão Europeia Horizonte 2020, é composto por um consórcio que envolve 16 parceiros de 10 países e que foi criado com o objetivo de valorizar os resíduos agrícolas da produção comercial de cogumelos.

Pretende desenvolver métodos facilmente aplicáveis à escala industrial, a um baixo custo e que permitam obter produtos químicos de valor acrescentado. É um novo conceito de biorrefinaria com uma abordagem em cascata e seguindo várias etapas:

- 1- Extração por micro-ondas:** trata-se de uma técnica de extração rápida e fiável de onde resultarão vários tipos de compostos, tais como produtos antimicrobianos, antioxidantes ou polióis, que serão aplicados noutros processos de produção de alimentos, produtos de limpeza ou plásticos.
- 2- Extração pressurizada com água quente:** é uma técnica que utiliza as altas pressões para manter solventes aquosos no estado líquido a altas temperaturas. Permite obter proteínas e polissacarídeos com propriedades texturizantes e prebióticas que podem ser usados diretamente como suplementos alimentares.
- 3- Sacarificação e fermentação:** é uma metodologia que visa a obtenção de açúcares simples, que constituem o ponto inicial para a produção de biopoliésteres por fermentação (PHAs). Após a extração pressurizada de água quente os resíduos de cogumelos ricos em açúcares são utilizados como fonte de carbono por um microrganismo capaz de produzir um bioplástico.
- 4- Digestão anaeróbica:** O remanescente de biomassa não utilizada nos processos anteriores será utilizado para a produção de biogás por digestão anaeróbica.

Alguns dos subprodutos provenientes destas etapas já começaram a ser testados, e os muito promissores resultados suscitaram também bastante interesse. Destacam-se especialmente a substituição de químicos em produtos cosméticos, a reformulação de alimentação rica em antioxidantes e proteínas para idosos ou a produção de plásticos biodegradáveis (Funguschain Project, 2017).



Figura 4 - Símbolo do projeto Funguschain (Funguschain Project, 2017)

#### **2.4. Entidade de acolhimento – Biotrend**

A Biotrend (Figura 5) é uma empresa que centra a sua atividade na investigação, sendo especializada no desenvolvimento, otimização e aumento de escala de bioprocessos. Além disso, desenvolve projetos internos que visam a produção de produtos químicos, biomassa, biopolímeros ou enzimas recombinantes a partir de matérias-primas renováveis. Possui serviços avançados que permitem desenhar processos competitivos, robustos e economicamente viáveis transponíveis para escalas relevantes, nas áreas da biotecnologia industrial e marinha (Biotrend, 2020).



Figura 5 - Logótipo da empresa (Biotrend, 2020)

A Biotrend está localizada no Biocant Park no concelho de Cantanhede, distrito de Coimbra, onde desenvolve as suas atividades em três espaços. Um laboratório de desenvolvimento, onde podem ser feitos vários tipos de ensaios, desde cultivos à escala de 1 mL até fermentações em bio-reator até à escala de 2 litros; um laboratório analítico com valências de HPLC, GC-MS, ensaios enzimáticos, espectrofotométricos ou de eletroforese; e uma unidade piloto, onde é realizado o aumento de escala dos bioprocessos em biorreactores

de 10, 50 e 240 litros, possuindo também diversos equipamentos necessários ao processamento pós-produção como uma ultra-centrífuga, centrífugas tubular e de discos, uma decantadora contínua, homogeneização de alta pressão, equipamento de filtração de fluxo tangencial e equipamento de secagem por atomização (*spray-dryer*).

Os bioreatores disponíveis são todos da marca New Brunswick Scientific/Eppendorf. A medição de pH é realizada em linha por um sensor e o seu controlo através da adição automática de ácido e base através de bombas peristálticas. Do mesmo modo, uma bomba peristáltica adiciona um agente anti-espuma sempre que o respectivo sinal é emitido pelo sensor dedicado. O oxigénio dissolvido é medido por um sensor polarográfico, sendo a alimentação de ar feita por via de um controlador de caudal mássico e a agitação é promovida por um motor cujo veio tem montadas duas turbinas de *Rushton*, com velocidade de rotação também controlada automaticamente para manter a concentração de oxigénio dissolvido desejada. A monitorização dos vários parâmetros é possível através do *software BioCommand*<sup>®</sup>. No caso dos bioreatores de 2L, de vidro, a esterilização é feita em autoclave vertical, em todos os outros bioreatores, de aço inoxidável, a esterilização é realizada *in situ*.

Neste laboratório existe ainda uma unidade de extração de biopolímeros. Conta, ainda, com uma equipa de 11 elementos altamente qualificados e experientes.

## **2.5. Objetivos do estágio profissionalizante**

Este estágio teve como objetivo a otimização de um bioprocessos para produção de PHAs, nomeadamente o PHB, utilizando resíduos da indústria de produção de cogumelos. Pretendeu-se a aquisição de competências práticas no desenvolvimento e otimização de bioprocessos a várias escalas, nomeadamente em biorreactores operados em modo *fed-batch*. Assim como, adquirir competências no planeamento de ensaios experimentais, realização de análises para o acompanhamento dos bioprocessos e elaboração de relatórios técnicos

### 3. Trabalho experimental

Para a realização deste trabalho experimental foi testada a capacidade de produção de PHB pela bactéria *P. sacchari* utilizando dois tipos de matérias primas como fonte de carbono, provenientes de cogumelos. Ao longo do trabalho, foram utilizados vários métodos analíticos que permitiram não só caracterizar as matérias primas como acompanhar a evolução de vários parâmetros dos ensaios laboratoriais.

#### 3.1. Ensaios à escala laboratorial

Para a realização deste trabalho. Começou-se por testar um hidrolisado de cogumelos obtido por hidrólise ácida de resíduos de cogumelos e rico em glucose. Posteriormente testou-se um extrato de pó de cogumelos rico em manitol. A Figura 6 representa esquematicamente o processo de obtenção do extrato e do hidrolisado de cogumelo.

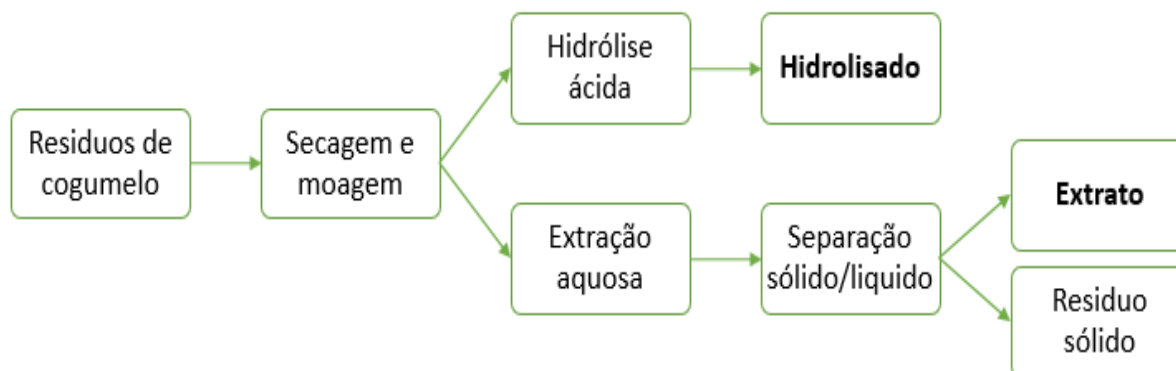


Figura 6 – Esquema representativo da obtenção do hidrolisado e do extrato de cogumelo.

##### 3.1.1. Ensaio com hidrolisado de cogumelos

O hidrolisado testado, fornecido por um dos parceiros do projeto, apresentava-se como um fluido de cor castanho escuro com sólidos em suspensão. Para a sua caracterização foi medido o pH, determinada a massa específica, as concentrações em sais inorgânicos (amónia ( $\text{NH}_4^+$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e magnésio/cálcio ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ )) assim como a concentração de açúcares dissolvidos.

Uma vez que a concentração de açúcares era relativamente baixa (48,54 g/L), o hidrolisado foi concentrado 3 vezes por evaporação recorrendo a um rotavapor (Heidolph Hei-Vap Core). Contudo, ao concentrar os açúcares do hidrolisado, todos os outros componentes são também concentrados. Assim, de forma a reduzir ou eliminar possíveis componentes inibidores de crescimento submeteu-se o hidrolisado concentrado a um tratamento de destoxificação. Para isso, adicionaram-se 2 g de carvão ativado a 365 mL de hidrolisado concentrado e incubou-se durante 1 h a 35 °C com agitação orbital de 150 rpm (Sartorius Certomat BS-1). Centrifugou-se por 10 min a 9000 rpm a temperatura controlada a 25/30 °C (Sigma 2-16KC). A sobrenadante resultante (cerca de 165 mL) foi submetido a um processo de destoxificação por *overliming* de forma a remover os fosfatos. Para tal, foi acrescentado hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) até se atingir um pH igual a 11 e foi novamente incubado por 3 h a 30 °C com rotação orbital de 150 rpm. Por fim, voltou a centrifugar-se nas mesmas condições referidas acima.

Após este processo foi necessário fazer uma retificação do pH pois, o crescimento ótimo da *P. sacchari* é a 6,60. Assim, corrigiu-se o pH usando NaOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até se atingir o pH pretendido. Decorrido este processo, fez-se uma centrifugação a 9000 rpm por 10 min com o objetivo de eliminar possíveis sólidos em suspensão. O sobrenadante foi novamente caracterizado e foi ainda pasteurizado numa estufa a 70 °C durante 1 hora, de forma a garantir esterilidade.

Após finalizar o pre-tratamento da matéria-prima, foi testada a capacidade de crescimento e produção de PHB da *P. sacchari* em meios contendo hidrolisado de cogumelo e hidrolisado de cogumelo concentrado e destoxificado assim como diferentes concentrações de açúcares.

Inocularam-se em duplicado balões de Erlenmeyer de 100 mL de capacidade contendo 25 mL de cada meio com cultura de *P. sacchari* criopreservada. O volume de cultura utilizado para a inoculação foi o volume suficiente para que a densidade ótica inicial fosse igual a 0,1. A incubação foi feita a 30 °C com rotação orbital de 150 rpm (New Brunswick Innova 44). A composição dos vários meios testados é apresentada na Tabela 1.



Tabela 1 - Composição dos vários meios utilizados no ensaio de crescimento com hidrolisado de cogumelos

Componente	M1	M2	M3	M4	M5	M6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Extrato de levedura (g/L)	1	1	1	1	1	1
Glicose (g/L)	-	10	20	-	10	-
Manitol (g/L)	-	-	-	20	10	-
Sol. PO <sub>4</sub> -NH <sub>4</sub> 10x (mL/L) (Anexo VII -)	100	100	100	100	100	100
Sol. oligonutrientes (mL/L) (Anexo VII -)	1	1	1	1	1	1
Hidrolisado de cogumelo (mL/L)	20	10	-	-	-	-
Hidrolisado de cogumelo concentrado e destoxificado (mL/L)	-	-	-	-	-	20

### 3.1.2. Ensaio com o extrato de pó de cogumelo

O pó de cogumelo caracteriza-se como um pó seco muito fino e esbranquiçado muito pouco solúvel em água. De forma a extrair o manitol (fonte de carbono) do pó de cogumelo procedeu-se da seguinte forma. Fez-se uma suspensão de cerca de 13 % do pó em água (Figura 7) e esterilizou-se em autoclave a 121 °C por 20 min.



Figura 7 - Suspensões de pó de cogumelo pronto para ir à autoclave

As suspensões esterilizadas foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 min (Thermofisher Scientific Lynx 6000). O sobrenadante foi depois filtrado em 4 etapas. Primeiro em gaze de algodão, por papel de filtro 2 µm, depois em filtro de 0,8 µm e por fim por filtro de 0,22 µm (Figura 8) obtendo-se assim um extrato límpido e estéril.



Figura 8 – Etapas de filtração do extrato do pó de cogumelo

O filtrado obtido foi depois concentrado num rotavapor (Heidolph Hei-Vap Core) de forma a aumentar a concentração de açúcares, sendo depois submetido a um processo de destoxificação por *overliming* de forma a remover os fosfatos. Para isso, adicionou-se hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) até se atingir um pH igual a 11, incubou-se por 3 h a 30 °C com rotação orbital de 150 rpm (Sartorius Certomat BS-1), ajustou-se o pH para 6.60 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98 % e centrifugou-se a 8000 rpm por 15 min (Thermofisher Scientific Lynx 6000). Por fim pasteurizou-se o sobrenadante obtido.

O estudo do crescimento e produção de PHB pela *P. sacchari* utilizando extrato de pó de cogumelo realizou-se da mesma forma e condições que o ensaio com o hidrolisado de cogumelos. Inocularam-se balões de Erlenmeyer de 100 mL de capacidade contendo 25 mL de cada meio com cultura de *P. sacchari* criopreservada. O volume de cultura utilizado para a inoculação foi o volume suficiente para que a densidade ótica inicial fosse igual a 0,1 e a incubação foi feita a 30 °C com uma rotação orbital de 150 rpm (New Brunswick Innova 44).

De forma a se obter uma curva de crescimento completa foram realizados dois ensaios independentes desfasados, cujas inoculações se efetuaram em momentos diferentes, uma de manhã e outra à tarde. A composição dos vários meios utilizados apresenta-se na Tabela 2. Neste ensaio, o volume de extrato de cogumelo utilizado em cada meio foi definido tendo em conta a concentração de manitol existente no mesmo, de forma a serem testadas várias concentrações de manitol.

Tabela 2 Composição dos meios utilizados no ensaio de crescimento com extrato de pó de cogumelo

Componente	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	-	-	1	1	1	4	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	0,2	0,2	0,2	1,2	0,2
Sol. Oligonutrientes (mL/L)	-	-	1	1	1	1	1
Extrato de levedura (g/L)	-	-	-	1	1	1	1
EDTA (g/L)	-	-	-	-	0,03	-	-
Extrato de cogumelo (g/L de manitol)	10	20	20	20	20	10	20

## 3.2. Ensaio à escala piloto em Biorreactor

### 3.2.1. Características dos biorreactores

Como biorreactores foram utilizados os sistemas New Brunswick Scientific/Eppendorf BioFlo 115 (Figura 9). Estes reatores podem ser utilizados em modo de funcionamento descontínuo (*batch*), semi-contínuo (*fed-batch*) ou contínuo controlando as condições de pH, temperatura, oxigénio dissolvido, agitação mecânica. A adição de ácido e base para controlo de pH é feita automaticamente por bombas peristálticas assim como o anti-espuma. O *Biocommand*<sup>®</sup> é o *software* utilizado pelo equipamento para a aquisição de dados dos vários sensores assim como o controlo das bombas peristálticas. Os vasos de fermentação, utilizados, têm a capacidade total de 3 L, no entanto, a sua capacidade útil é de 2,2 L. O aquecimento é feito com recurso a mantas de aquecimento e o arrefecimento usando um circuito de água canalizada. A admissão de ar é efetuada por uma fonte de ar comprimido externo, a um caudal pré-escolhido pelo utilizador, ou sob acção do sistema de controlo de oxigénio dissolvido, que após passagem através de um filtro de 0,2 µm garante a sua esterilidade. O ar é admitido à cultura por um difusor em anel perfurado localizado no fundo do fermentador.

A agitação mecânica ao longo das fermentações é promovida por um motor acoplado a um veio de agitação colocado no topo do vaso, que permite uma velocidade de agitação entre os 50 e os 1200 rpm. É possível a programação de uma cascata de agitação com a concentração de oxigénio dissolvido, o que permite manter a saturação em oxigénio dissolvido a valores predefinidos desejados. Desta forma, havendo maior necessidade de oxigénio dissolvido, a agitação aumenta ao invés de se aumentar o caudal de ar. Desta forma, a agitação oscila automaticamente entre um valor máximo e um mínimo pré-

definidos, a fim de manter uma determinada concentração de oxigênio dissolvido. A esterilização do reator é feita com recurso a autoclave.



Figura 9 – Reator New Brunswick Scientific/Eppendorf BioFlo 115.

### 3.2.2. Condições dos ensaios em biorreator

Foram realizados três ensaios de crescimento em biorreator em modo de operação *fed-batch* onde se testou como fonte de carbono, o hidrolisado de cogumelo destoxificado e concentrado (FERM-1), uma solução de 200 g/L de manitol (FERM-2) e o extrato de pó de cogumelo (FERM-3). Estas soluções foram adicionadas como alimentação no decorrer das fermentações.

Em ambas as fermentações, a temperatura foi controlada a 30 °C e a concentração de oxigênio dissolvido a 30 % (sendo reduzida a 10 % após 7 h de fermentação). O caudal inicial de ar foi definido para 1,2 L/min (1 vvm) e o pH mantido a 6,45 ( $\pm 0,1$ ) utilizando soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 14% (base) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N (ácido). Para controlar a formação de espuma durante o ensaio foi utilizado anti-espuma simeticone 70 % (Dow Corning, Simethicone). Todos os ensaios foram realizados com um volume inicial de meio de 1,2 L. No caso do ensaio FERM-1 a composição é apresentada na Tabela 3 e no caso dos ensaios FERM-2 e FERM-3 a composição é a apresentada na Tabela 4. A alimentação foi iniciada quando houve uma queda

abrupta agitação, em resultado da redução da necessidade de oxigénio dissolvido. Isto sucede quando a fonte de carbono se esgota. Assim, foi usada uma estratégia de adição automática da alimentação baseada no esgotamento da fonte de carbono.

Tabela 3 – Composição do meio inicial de fermentação na FERM-1.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Sacarose	20,0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g/L
Citrato de sódio	2,6 g/L
EDTA	0,03 g/L
Solução oligonutrientes	10,0 mL/L

Tabela 4 – Composição do meio inicial de fermentação na FERM-2 e FERM-3.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Manitol	20,0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g/L
Citrato de sódio	2,6 g/L
<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
EDTA	0,03 g/L
Solução oligonutrientes	10,0 mL/L

O inóculo de fermentação consistiu em 65 mL de cultura *P. sacchari* cultivada num balão de Erlenmeyer de 500 mL de boca larga com meio PHB (Tabela 5) e incubado durante 20 h a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm.

Tabela 5 – Composição do meio PHB para preparação do inóculo

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>	
Sacarose	10,0	g/L
Extrato de levedura	1,0	g/L
Solução PO <sub>4</sub> -NH <sub>4</sub> 10x	100	mL/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	g/L
Solução oligonutrientes	1,0	mL/L

### 3.3. Métodos analíticos

#### 3.3.1. Medição de densidade ótica

Uma forma rápida, embora indireta, de estimar a concentração de uma cultura celular é avaliando a sua turbidez. Contudo, este método não permite distinguir o estado das células contabilizando tanto as células viáveis como as inviáveis, e por isso os valores não são absolutos. Ainda assim, é um método muito expedito no acompanhamento do crescimento microbiano (Sutton, 2011)

Ao longo deste trabalho foi avaliada a densidade ótica das culturas (Figura 10). Em cada ensaio foram retiradas amostras ao longo do tempo. Cada amostra foi diluída de forma a que o valor de absorvância medida estivesse dentro do intervalo aconselhado pelo fabricante do espectrofotómetro (0,2 a 0,8). As diluições foram feitas sempre para um volume final de 3 mL e no mínimo diluídas 10 vezes. A amostra diluída foi depois colocada numa cuvete de vidro com 1 cm de percurso ótico e a absorvância foi medida num espectrofotómetro (Shimadzu Corporation – modelo UV-1700). A absorvância real da amostra obtém-se multiplicando a absorvância obtida pela diluição utilizada.

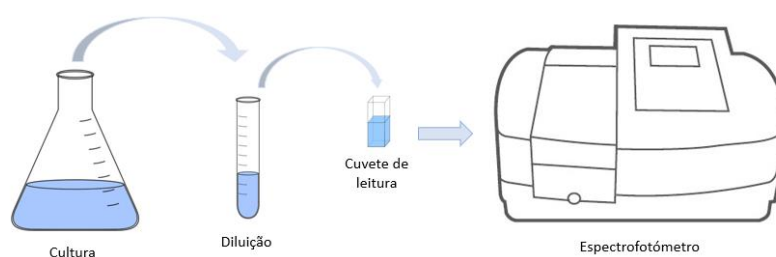


Figura 10 - Esquema do método para leitura da densidade ótica

#### 3.3.2. Determinação do peso seco celular

A quantificação do peso seco é uma técnica importante para determinar a quantidade celular presente na cultura. Contudo, é um método mais demorado que a medição da densidade ótica. O método consiste em centrifugar um volume pré-definido de cultura, descartar o sobrenadante e depois secar a biomassa celular (o sedimento) até peso constante

(Nitzke & Biedrzycki, n.d.), simplesmente secar em estufa um volume determinado de cultura até peso constante ou utilizando uma termobalança própria para o efeito.

Assim, para a quantificação do peso seco das amostras ao longo deste trabalho procedeu-se como esquematizado na Figura 11. Pesaram-se microtubos de 1,5 mL previamente secos até peso constante. Colocou-se 1 mL de cada amostra nos microtubos secos e centrifugaram-se por 2 min à velocidade de 13 200 rpm (centrifuga Eppendorf 5415D). Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água desionizada de forma a ressuspender e lavar o sedimento. Voltou-se a centrifugar durante 2 min nas mesmas condições. Foi efetuado um segundo passo de lavagem e após a terceira centrifugação retirou-se o

sobrenadante e colocaram-se as amostras a secar numa estufa a 70 °C até peso constante.

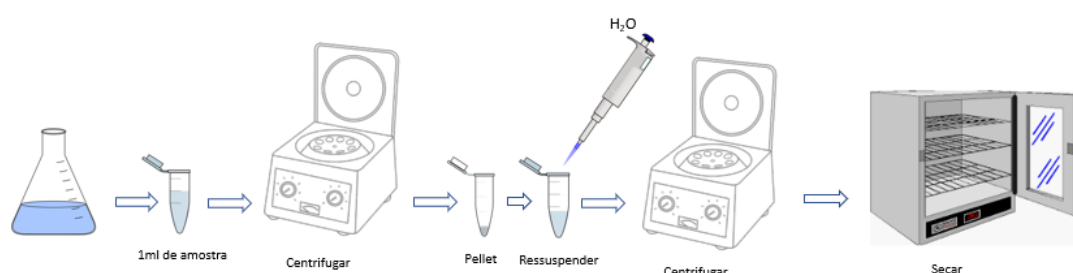


Figura 11 - Esquema do método de determinação do peso seco celular

O cálculo da concentração celular em g/L em base seca é feito pela aplicação da equação 1.

$$[g/L] = \frac{(Massa\ do\ microtubo +\ biomassa\ seca) - Massa\ do\ microtubo\ vazio}{volume\ de\ amostra} \quad (1)$$

### 3.3.3. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

A quantificação de açúcares e ácidos orgânicos ao longo deste trabalho foi feita com recurso a cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). É uma técnica que tira partido da distribuição de moléculas entre uma fase móvel e uma fase estacionária (coluna). Diferentes afinidades entre compostos e os constituintes da coluna faz com que aqueles eluam em tempos distintos, permitindo a sua quantificação após passagem por um detetor. O resultado é apresentado sob a forma de um cromatograma (Câmara, 2010; EAG, n.d.).

Ao longo deste trabalho todas as amostras foram analisadas num equipamento de HPLC (Shimadzu Corporation LC-2010 CHT). As amostras para análise foram preparadas da seguinte forma: centrifugaram-se 500  $\mu\text{L}$  de amostra durante 2 min à velocidade de 13200 rpm (centrifuga Eppendorf 5415D); retiraram-se 300  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para um microtubo e adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 50 mM a esse sobrenadante e centrifugou-se novamente nas mesmas condições (2 min, 13200 rpm); após a centrifugação retiraram-se 300  $\mu\text{L}$  do líquido para um *vial* de HPLC e acrescentaram-se mais 300  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 50 mM. Colocaram-se os *vials* no equipamento de HPLC com amostrador automático.

O equipamento de HPLC utilizado possui dois detetores montados em série (índice de refração e UV), permitindo a quantificação simultânea de múltiplos compostos como açúcares e ácidos orgânicos. As concentrações de açúcares e ácidos orgânicos são, assim, obtidas diretamente recorrendo a curvas de calibração para cada composto, previamente inseridas no software. A coluna utilizada para quantificar açúcares e ácidos orgânicos é uma coluna Shodex SH1011, 8.0mmx300mm, utilizando como fase móvel  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5 mM e um caudal de 0.6 mL/min com forno a 50 °C. A duração das corridas foi de 30 minutos cada.

### **3.3.4. Determinação de sais inorgânicos**

A determinação da concentração de sais inorgânicos existente ao longo dos ensaios de crescimento em biorreactor, seja à escala laboratorial ou piloto, é muito importante pois, permite saber se houve défice ou acumulação de algum desses sais, interferindo no metabolismo do microrganismo e, neste caso, da forma como privilegia o crescimento ou a acumulação de PHB. Assim, foram determinadas as concentrações de iões de amónia ( $\text{NH}_4^+$ ), iões fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e iões magnésio/cálcio ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ), utilizando métodos colorimétricos

Na determinação da concentração dos iões fosfato começou-se por centrifugar 300  $\mu\text{L}$  de amostra durante 2 min a 13 200 rpm (centrifuga Eppendorf 5415D). Pipetaram-se 25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um tubo de ensaio limpo e seco, adicionaram-se 5200  $\mu\text{L}$  de água ultra pura e agitou-se bem, recorrendo à utilização de um vórtex. Retiraram-se 200  $\mu\text{L}$  para um microtubo e reservou-se para a determinação da concentração de iões de amónia. Ao restante acrescentaram-se 800  $\mu\text{L}$  de reagente combinado (Anexo I -), procedeu-se à agitação com vórtex, taparam-se os tubos de ensaio com papel de alumínio e deixou-se reagir durante 2 h à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foram colocados em duplicado 300  $\mu\text{L}$  de



cada amostra numa placa de 96 poços e posteriormente foram lidas as absorvâncias a 850 nm num leitor de microplacas (Biotek PowerWave XS MQX200R). Ao mesmo tempo que este procedimento foi cumprido, foi realizada a mesma metodologia numa amostra de água destilada que serviu de branco.

Seguiu-se a determinação da concentração de iões amónia. Aos 200 µL reservados anteriormente adicionaram-se 2800 µL de água ultrapura, 10 µL de solução 2-fenilfenol a 264 g/L, 10 µL de solução de nitroprussiato de sódio 5 g/L, 25 µL de solução oxidante (Anexo I -) e misturou-se bem após cada adição, recorrendo ao vórtex. De seguida, taparam-se os tubos de ensaio com papel de alumínio e deixou-se reagir por 1,5 h à temperatura ambiente. Por fim foram colocados em duplicado 300 µL de cada amostra e do branco numa placa de 96 poços e posteriormente lidas as absorvâncias a 665 nm no leitor de microplacas.

Por último foi feita a determinação da concentração de iões magnésio. Começou-se por preparar uma solução diluída a partir de uma solução mãe de Eriochrome® *Black T* (Sigma Aldrich) a 6 g/L adicionando 5 mL de água ultrapura a 500 µL da solução mãe. Centrifugaram-se 100 µL de amostra durante 2 min a 13200 rpm e pipetaram-se 50 µL do sobrenadante para um tubo de ensaio limpo e seco. Acrescentaram-se 950 µL de água ultrapura, 200 µL de solução tampão pH 10 (Anexo I -), 100 µL da solução diluída de *Black T* e agitou-se bem. Tal como anteriormente, foi preparado um branco com água destilada, ao qual se procedeu da mesma forma como na preparação das amostras. Por último, adicionou-se a cada tubo de ensaio uma solução Na<sub>2</sub>EDTA 0,0083 g/L gota a gota, agitando entre cada adição. Ao haver mudança de cor de violeta para azul parou-se a adição e contabilizou-se o volume adicionado. A concentração é depois determinada tendo em conta este volume e recorrendo a uma curva de calibração (Anexo II -).

### **3.3.5. Quantificação de PHB**

A concentração de PHB foi determinada recorrendo à técnica de HPLC que quantifica o ácido crutónico resultante da hidrólise ácida do polímero. Para isso as amostras foram preparadas da seguinte forma: pipetaram-se 50 µL de amostra de caldo para um microtubo e adicionou-se 1 mL de água desionizada. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se durante 1 min a 13200 rpm. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1 mL de água desionizada, agitou-se vigorosamente de forma a ressuspender o sedimento. Centrifugou-se,

novamente nas mesmas condições (1 min, 13200 rpm). Descartou-se o sobrenadante, soltou-se o sedimento recorrendo ao vórtex e centrifugou-se durante 3 s apenas para recuperar a totalidade da amostra no fundo do microtubo. Depois de lavadas as amostras, fez-se a sua digestão procedendo da seguinte forma: à amostra lavada acrescentaram-se 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98% e agitou-se bem; transferiu-se todo o volume para tubos de ensaio de vidro e colocaram-se numa incubadora (Eppendorf ThermoMixer C) a 95-98  $^\circ\text{C}$  por 30 min a 300 rpm. Decorrido este período, retiraram-se os tubos do equipamento e deixaram-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, agitaram-se muito bem e retiraram-se 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra para um microtubo, acrescentou-se 900  $\mu\text{L}$  de água desionizada e voltou-se a agitar. Retiraram-se 100  $\mu\text{L}$  para um vial, acrescentaram-se 900  $\mu\text{L}$  de água desionizada e colocaram-se no HPLC, utilizando uma coluna ROA *organic acid*  $\text{H}^+$ , 30 mm x 4.6mm,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5 mM como fase móvel a um caudal de 0.2 mL/min e uma temperatura de forno de 35  $^\circ\text{C}$ . Utilizou-se um detetor PDA (*Photo Diode Array*) para a identificação do ácido crotonico, em corridas com duração de 6 minutos (Anexo III -). As concentrações de PHB são dadas diretamente pelo equipamento, utilizando uma recta de calibração obtida previamente.

### **3.3.6. Medição de pH**

A medição do pH foi feita recorrendo a um medidor de pH (Metrohm E-744, Sóquímica) calibrado com soluções tampão pH 4 e pH 7.

### **3.3.7. Massa específica**

A massa específica foi determinada pela pesagem de um volume conhecido (balança analítica Kern ABS).

## 4. Apresentação de resultados e discussão

### 4.1. Ensaio laboratoriais com hidrolisado

Após o processo de concentração e destoxificação foram notórias as diferenças na caracterização do hidrolisado (Tabela 6). Devido à adição do hidróxido de cálcio durante o processo de destoxificação o pH final é bastante mais alto, assim como a concentração de iões cálcio. O processo permitiu a remoção total de fosfato bem como o aumento da concentração de açúcares e diminuição da concentração de elementos tóxicos tais como o furfural e o ácido fórmico que poderiam ter influência no crescimento celular.

Tabela 6 – Características dos hidrolisados antes e depois do processo de concentração e destoxificação.

	pH	Massa específica (g/mL)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mM)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM)	Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (mM)
<b>Hidrolisado de cogumelos</b>	1,19	1,03	8,93	16,15	5,41
<b>Hidrolisado de cogumelos concentrado (3x)</b>	0,74	1,10	17,38	40,85	13,00
<b>Hidrolisado 3x concentrado e destoxificado</b>	10,92	1,10	0	39,46	119,22

A identificação dos açúcares e ácidos orgânicos presentes no hidrolisado de cogumelos, assim como a suas concentrações são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e furfural no hidrolisado antes e depois do processo de concentração e destoxificação, determinadas por HPLC.

Açúcar/ácido	Concentração (g/L)		
	Hidrolisado de cogumelos	Hidrolisado de cogumelos concentrado (3x)	Hidrolisado concentrado (3x) e destoxificado
Glicose	37,09	110,54	91,89
Manitol	9,29	28,08	29,03
Galactose	1,79	1,63	1,69
Frutose	0,47	3,99	5,17
Xilose	0,2	0,34	2,1
Ácido Cítrico	0,27	0,81	0,08
Ácido Pirúvico	0,12	0,17	0,32
Ácido Málico	0,00	0,00	0,46
Ácido Sucínico	16,06	53,22	48,8
Ácido Láctico	0,00	0,00	0,9
Ácido Fórmico	2,34	6,67	0,75
Ácido Acético	3,31	8,56	6,55
Ácido Butírico	0,04	0,23	0,00
Ácido Propiônico	0,04	0,00	0,00
Furfural	0,21	0,01	0,009

Como observado na Figura 12, foi possível verificar crescimento da *P. sacchari* nos vários meios testados. Nos meios suplementados apenas com açúcares comerciais (M3, M4 e M5) observou-se que o crescimento não foi muito diferente sendo ligeiramente superior quando a fonte de carbono continha manitol (M4 e M5). No meio M1, em que a fonte de carbono provinha apenas dos açúcares presentes no hidrolisado de cogumelo observou-se um prolongado período de latência sendo que o crescimento só foi significativo após 24 horas de cultivo, o que não se verificou no meio M2 que foi suplementado com glucose (50 % hidrolisado + 50 % glucose), observando-se um ligeiro aumento no crescimento. No entanto, o melhor crescimento celular foi obtido no meio em que se usou o hidrolisado de cogumelo concentrado e destoxificado (M6), obtendo-se maiores densidades óticas quando comparado com as outras condições experimentais (Figura 12).

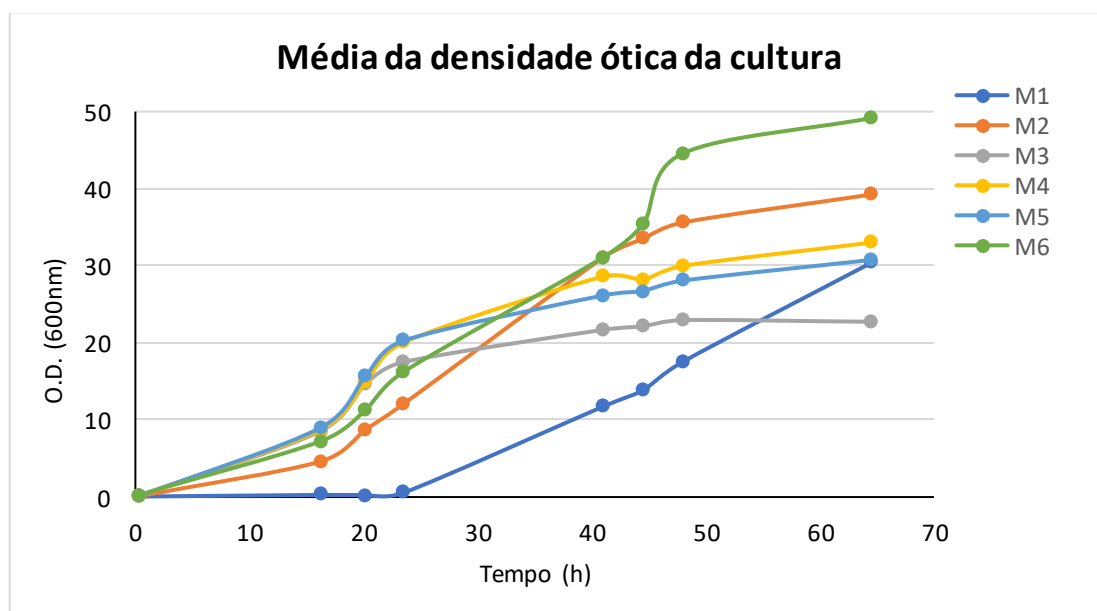


Figura 12 – Perfil de crescimento da *P. Sacchari* ao longo do tempo nos diferentes meios. Meio M1 contendo hidrolisado de cogumelos; meio M2 contendo hidrolisado de cogumelos e glucose; meio M3, M4 e M5 contendo diferentes concentrações de açúcar comercial; e meio M6 contendo hidrolisado de cogumelo 3x concentrado.

A Figura 13 compara o consumo total de açúcares. O consumo de açúcares foi parcial no meio contendo hidrolisado de cogumelo (M1), tendo o consumo sido muito lento pelo que após 65 h a concentração de glucose era ainda de 6 g/L. Nos restantes meios o consumo de glucose foi mais rápido e após 50 h já não restava glucose no meio. Embora nos meios M2 e M6 as taxas de crescimento iniciais tenham sido semelhantes ao verificado nos meios em que apenas se usaram açúcares comerciais como fonte de carbono (M3, M4 e M5), não se

verificou consumo imediato de açúcar, indicando que o crescimento inicial se deveu à metabolização de componentes presentes do hidrolisado.

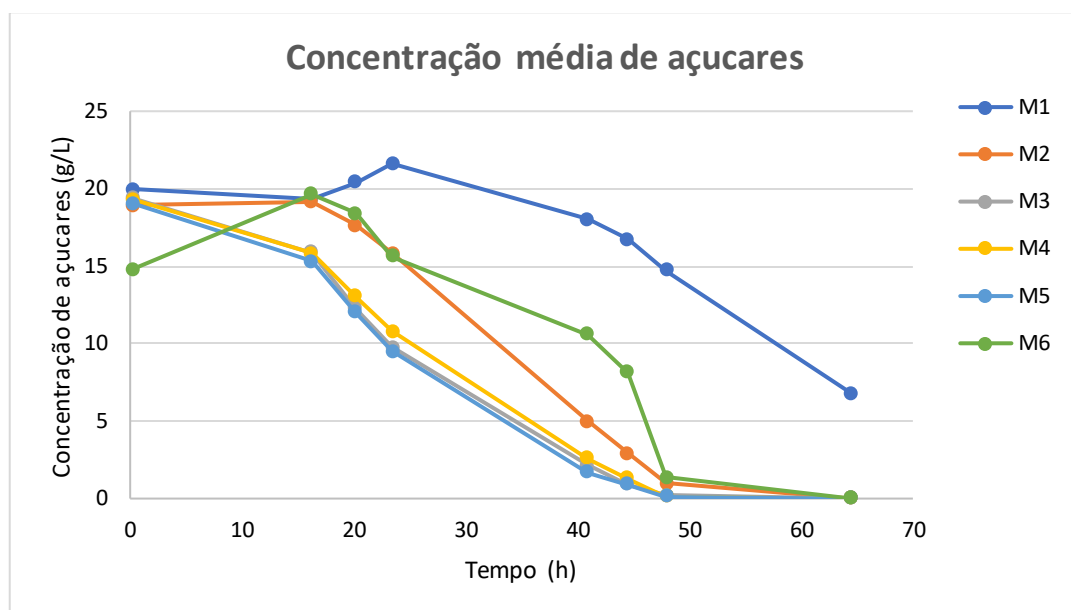


Figura 13 – Consumo comparativo de açúcares totais ao longo do tempo para os meios: M1 contendo hidrolisado de cogumelos; M2 contendo hidrolisado de cogumelos e glucose; meio M3, M4 e M5 contendo diferentes concentrações de açúcar comercial; e meio M6 contendo hidrolisado de cogumelo 3x concentrado.

Relativamente à produção de PHB (Figura 14) a *P. sacchari* foi capaz de produzir PHB tanto no meio com hidrolisado de cogumelo como no meio com hidrolisado de cogumelo destoxificado. No entanto, verificou-se que a produção foi maior no meio com hidrolisado de cogumelo suplementado com glucose (M2), com manitol (M4) ou quando o meio continha o hidrolisado de cogumelo destoxificado (M6).

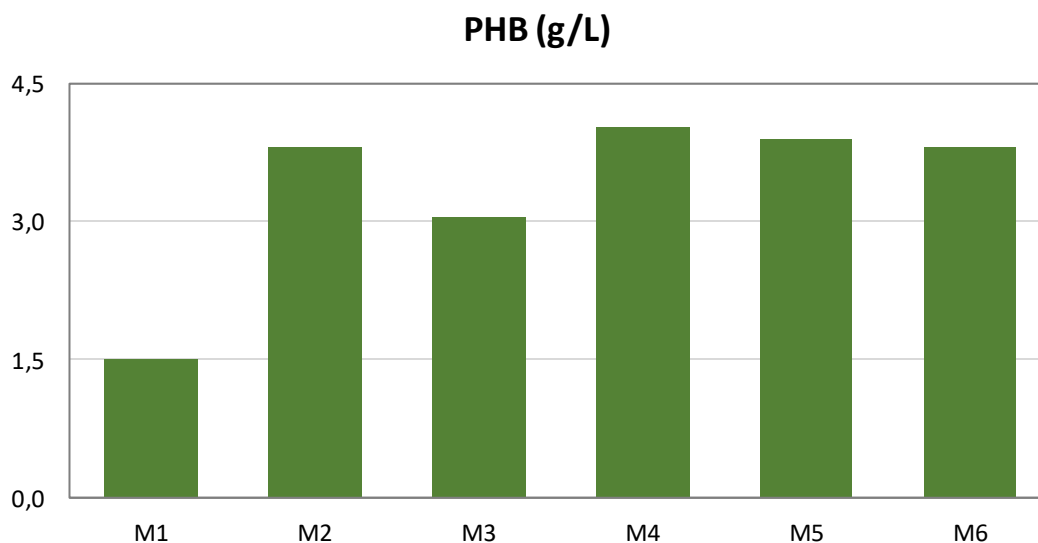


Figura 14 – Concentração final de PHB nos vários meios: M1 contendo hidrolisado de cogumelos; M2 contendo hidrolisado de cogumelos e glucose; meio M3, M4 e M5 contendo diferentes concentrações de açúcar comercial; e meio M6 contendo hidrolisado de cogumelo 3x concentrado.

#### 4.2. Ensaio laboratoriais com extrato de pó de cogumelo

Após o tratamento térmico em autoclave, o extrato de cogumelo foi caracterizado e verificou-se que continha uma concentração elevada de fosfatos (Tabela 8) e baixa em açúcares (Tabela 9).

Tabela 8 - Registo dos valores obtidos de pH, densidade e sais inorgânicos do extrato de pó de cogumelo

pH	Massa específica (g/mL)	PO <sub>4</sub> (mM)	NH <sub>4</sub> (mM)	Mg/Ca (mM)
6,31	1,028	28,29	27,47	5,61

Tabela 9 - Registo das concentrações de açúcares e ácidos orgânicos do extrato de pó de cogumelo

Açúcar/ácido	Concentração (g/L)
Glicose	0,73
Manitol	24,53
Sacarose	0,48
Glicerol	0,19
Frutose	0,19
Ácido Cítrico	0,33
Ácido Pirúvico	0,06
Ácido Málico	1,02
Ácido Fumárico	0,36
Ácido Butírico	0,20
Ácido Propiónico	0,37
Ácido Adípico	0,19

O processo de concentração e posterior destoxificação permitiu aumentar consideravelmente a concentração de açúcares, principalmente o manitol (Tabela 11), e reduzir significativamente a concentração de fosfatos, cujo esgotamento durante o cultivo é benéfico para ser desencadeada a produção de PHB (Tabela 10).

Tabela 10 - Registo dos valores obtidos de pH, fosfato e amónia do extrato de pó de cogumelo

pH	PO <sub>4</sub> (mM)	NH <sub>4</sub> (mM)
5,86	2,62	117,49

Tabela 11 - Registro das concentrações de açúcares e ácidos orgânicos do extrato de pó de cogumelo

Açúcar/ácido	Concentração g/L
Glicose	9,10
Manitol	195,43
Celobiose	0,88
Ácido Cítrico	2,09
Ácido Pirúvico	0,19
Ácido Málico	13,71
Ácido Láctico	1,44
Ácido Fumárico	3,28

Nas condições de execução, o processo de obtenção do extrato de pó de cogumelo mostrou-se bastante demorado, dispendioso e com pouco rendimento. A partir de 12 L de suspensão de pó de cogumelo e decorrido todo o processo de concentração e destoxificação apenas se conseguiu obter 500 mL de extrato.

Observando a Figura 15 foi possível verificar crescimento da *P. sacchari* usando o extrato de pó de cogumelo, mas apenas nos meios que foram suplementados com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, solução de oligonutrientes, extrato de levedura ou EDTA o que sugere que o extrato de pó cogumelo não tem os nutrientes necessários para promover o crescimento deste microrganismo ou existem em concentração insuficiente.

Uma vez que não se verificou crescimento no meio M1 e M2, após 48,25 h de crescimento, pensou-se que poderia ser resultado de falta de componentes essenciais ao crescimento, e por esse motivo, fez-se uma adição de 1 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1 g/L de extrato de levedura. No entanto, após esta adição, não se observaram alterações significativas.

Nos meios M3, M4 e M5 observou-se uma estagnação no crescimento entre as 24 e as 54 h. Assim, decidiu-se adicionar 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pois poderia ser falta de fonte de azoto no meio por já ter sido todo consumido. Apesar desta adição, não houve alterações no crescimento da cultura o que poderá indicar falta de outro componente, acumulação de metabolitos tóxicos e/ou alteração das condições óptimas de cultura como alteração do pH, inibindo o crescimento

O meio M6, foi o meio onde se observou um maior crescimento microbiano, especialmente depois de se ter adicionado mais manitol após as 49,33 h de ensaio.

O meio M7 embora tivesse uma concentração mais elevada de açúcares, quando comparada com a do meio M6, tinha concentrações mais baixas de sulfato de amónia e de magnésio. Assim, após 24 h de cultivo foi feita a adição de 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aos balões com meio M7 verificando-se um ligeiro aumento na densidade ótica que acabou por estabilizar nas horas seguintes. Após 48,2 h de cultivo decidiu-se adicionar mais  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  até perfazer uma concentração no meio de 3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . No entanto, não se verificaram alterações no crescimento continuando o meio M6 a resultar em melhor crescimento. Esta observação indica que a hora a que a fonte de azoto é adicionada tem muita importância, pois nas fases iniciais de crescimento o microrganismo precisa de mais fonte de azoto na produção de proteínas e consequente multiplicação celular.

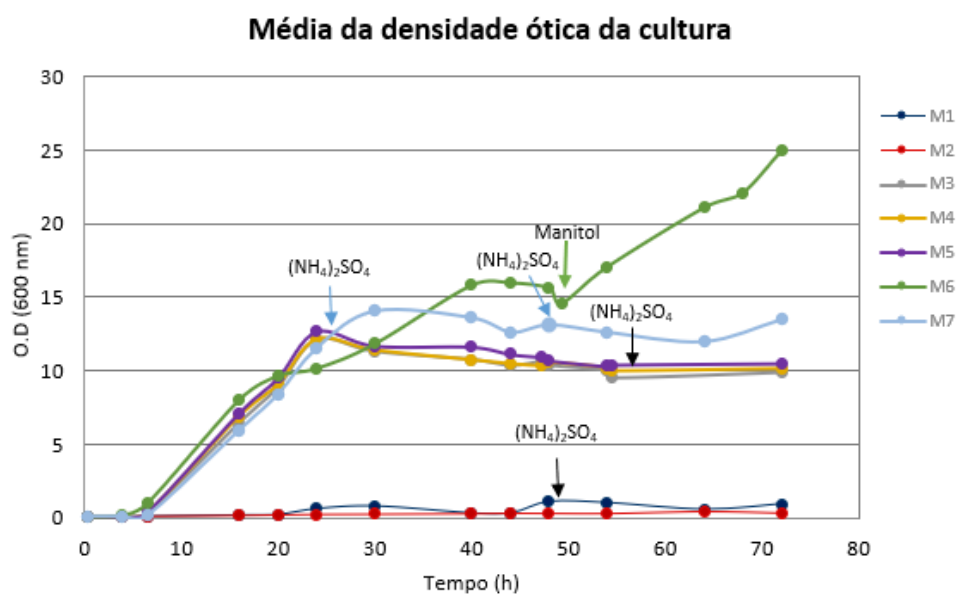


Figura 15 - Perfil de crescimento da *P. sacchari* ao longo do tempo para os diferentes meios: M1 e M2 contendo diferentes concentrações de extrato de pó de cogumelos; meio M3, M4, M5 e M6 contendo diferentes concentrações de extrato de pó de cogumelos e suplementados com sais minerais.



Relativamente ao consumo de açúcares, verificou-se que não houve praticamente nenhum consumo de manitol com exceção de no meio M6. Na Figura 16 pode-se ver o consumo de manitol, no entanto, o comportamento foi idêntico para a glucose e para o glicerol. É visível que o manitol foi praticamente todo consumido no meio M6 após 49,33 h, momento em que foi adicionado mais manitol, que voltou a ser metabolizado pelas células.

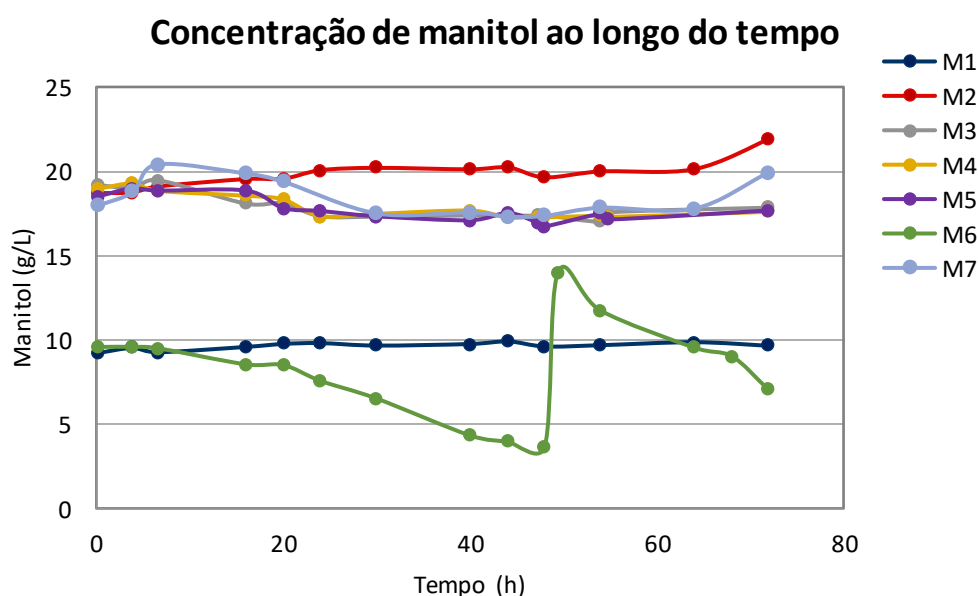


Figura 16 - Consumo de manitol ao longo do tempo nos vários meios

Uma vez que o consumo de açúcares foi bastante reduzido a análise de PHB foi feita apenas para o meio M6, no qual se verificou que atingiu uma concentração de 1,2 g/L.

### 4.3. Ensaio em Biorreactor

Com os resultados dos ensaios de crescimento em balão foi possível avançar para as fermentações em bioreator e utilizar as condições testadas mais promissoras. Assim, foram testados o hidrolisado de cogumelos concentrado e destoxificado e o extrato obtido utilizando o pó dos cogumelos. Adicionalmente, realizou-se uma fermentação utilizando manitol comercial, que serviu de referência ao ensaio com o extracto.

Na fermentação FERM-1, cuja fonte de carbono era o hidrolisado de cogumelo destoxificado e concentrado, verificou-se um aumento progressivo da densidade ótica da

cultura durante os períodos em que a fonte de carbono não estava limitada, situação que ocorreu por volta das 18 h de fermentação. Por volta das 6 h de fermentação o microrganismo tinha transformado toda a sacarose em glucose e frutose. Às 18 h de fermentação o microrganismo consumiu todas as fontes de carbono presentes (Figura 17).

Foi necessário fazer um pulso manual de alimentação às 8,25 h de fermentação pois, verificou-se que a concentração de açúcares já se encontrava em concentrações residuais. Uma vez que a quantidade do hidrolizado disponível era limitada, o último pulso foi realizado às 12,19 h de fermentação.

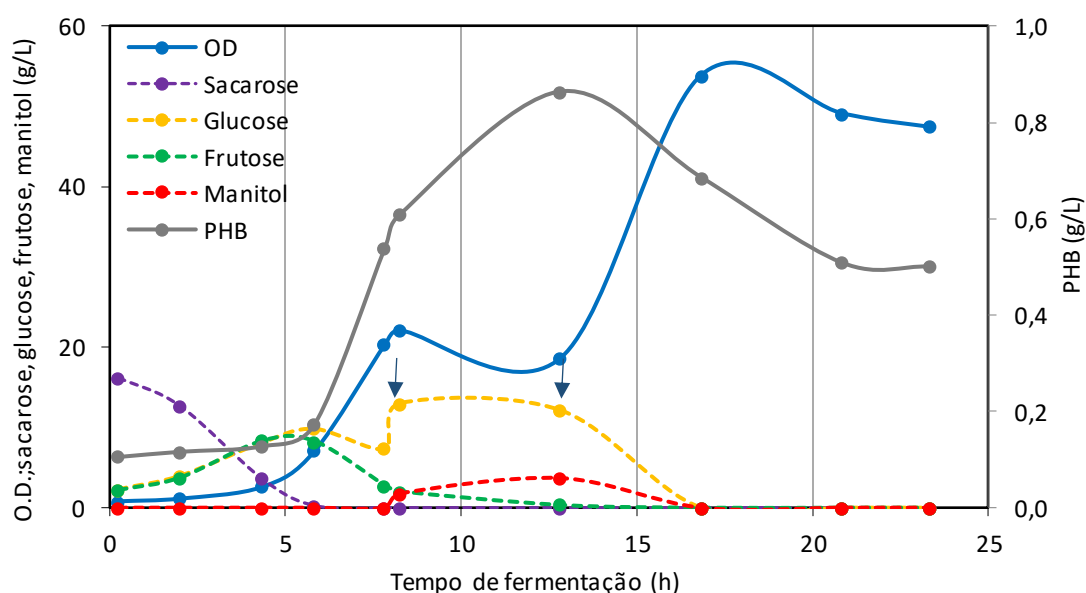


Figura 17 - Crescimento celular, consumo de açúcares (sacarose, glucose, frutose e manitol) e produção de PHB ao longo do ensaio FERM-1. Indicação por setas dos momentos em que foram dados pulsos de alimentação.

Observando a Figura 18 é possível verificar que não houve limitação das fontes de azoto, magnésio e fosfato. Não tendo sido metabolizado todo o fosfato, condição necessária à produção significativa de PHB, apenas houve uma produção basal de polímero. A sacarose presente na fase *batch* bem como os açúcares adicionados aquando dos pulsos de alimentação permitiram algum crescimento celular, mas não o suficiente para que todo o fosfato se esgotasse.

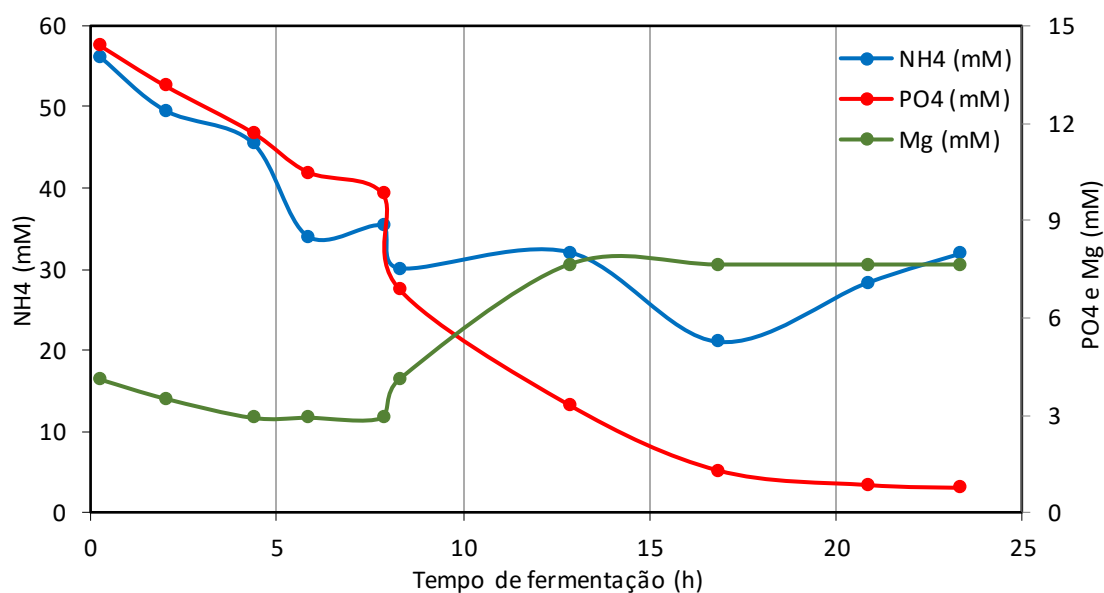


Figura 18 – Concentração de amônia, fosfato e magnésio ao longo da fermentação FERM-1.

No final da fermentação, obtiveram-se 0,5 g/L de PHB, correspondendo a um teor de 3 % em base seca. O fator limitante nesta fermentação foi claramente a falta de material de alimentação disponível para que a fermentação se prolongasse por mais horas. Desta forma não foi possível atingir elevadas densidades óticas nem produção significativa de PHB.

No que diz respeito às restantes fermentações: FERM-2 (alimentada com solução de manitol 200g/L) e FERM-3 (alimentada com extrato de pó de cogumelo) (Figuras 18 e 19, respetivamente), o comportamento foi bastante semelhante nas primeiras 14 h de fermentação, sendo os perfis de crescimento e taxas de consumo de manitol comparáveis. Após o primeiro pulso de corrente de alimentação, às 14 horas, o comportamento divergiu, muito possivelmente devido às diferentes composições da alimentação.

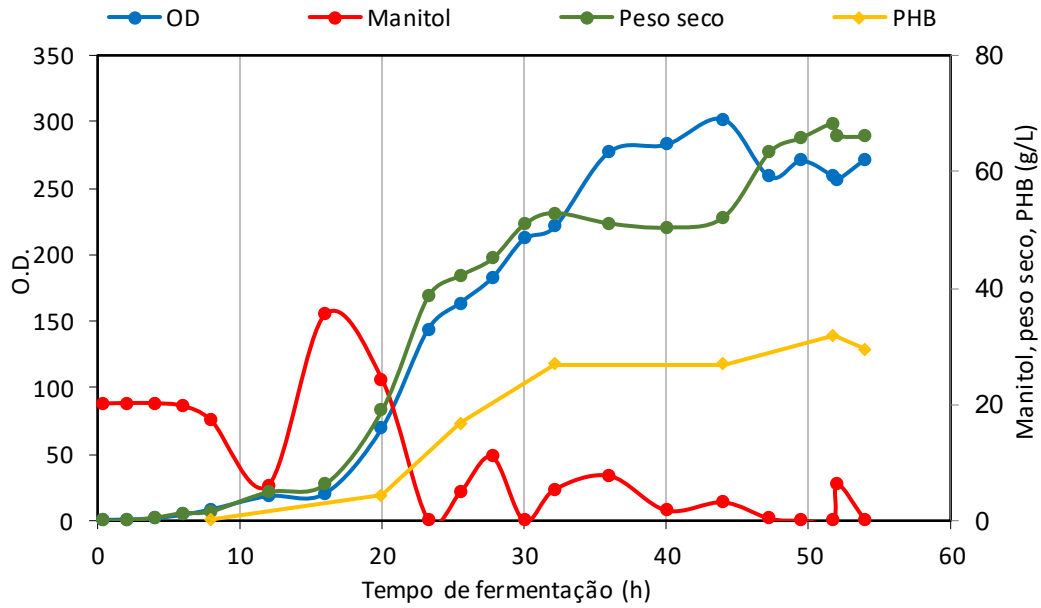


Figura 19 – Evolução do crescimento celular, peso seco, concentração de manitol e produção de PHB ao longo do ensaio FERM-2.

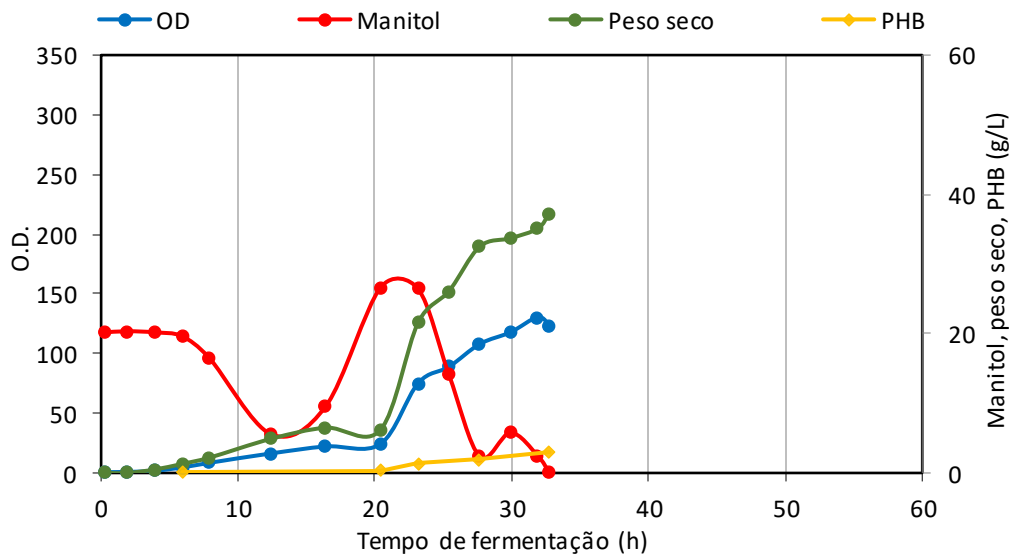


Figura 20 - Evolução do crescimento celular, peso seco, concentração de manitol e produção de PHB ao longo do ensaio FERM-3.

Na FERM-2 observou-se um crescimento sustentado até às 36 h havendo pequenas diminuições na taxa de crescimento quando o manitol se tornou limitante. Não houve uma limitação do azoto pois a adição de base foi constante. Por outro lado, verificou-se uma

diminuição substancial do magnésio que, embora nunca se tenha esgotado, pode ter influenciado o crescimento celular e consequente produção de PHB (Figura 21).

Na FERM-3 a limitação de magnésio não se observou possivelmente devido à concentração de cálcio/magnésio existente no extrato de pó de cogumelo (Tabela 8) usado como ingrediente na corrente de alimentação. Verificou-se, ainda, uma adição substancial de ácido (227,24 mL) e de base (38,64 mL) para manter o pH. O azoto não se tornou limitante tendo-se até acumulado ao longo da fermentação (Figura 22).

Em ambas as fermentações (FERM-2 e FERM-3) houve uma diminuição acentuada do fosfato, embora não se tenha esgotado. Ainda assim, houve acumulação de PHB especialmente na FERM-2, atingindo no final da fermentação uma concentração de 29,5 g/L com um teor celular de 45 %, em base seca. Na FERM-3 a produção de PHB foi bastante mais limitada obtendo-se uma concentração de 3,0 g/L de PHB com um teor celular de 8 % em base seca. Salienta-se, no entanto, que a fermentação foi prematuramente interrompida por não haver mais volume disponível de extracto de cogumelo. O perfil de crescimento observado até à paragem da fermentação, sugere que melhor produção de biomassa e de PHB seria possível caso mais solução de alimentação estivesse disponível. Mais uma vez, a produção de PHB foi limitada pela quantidade da alimentação disponível.

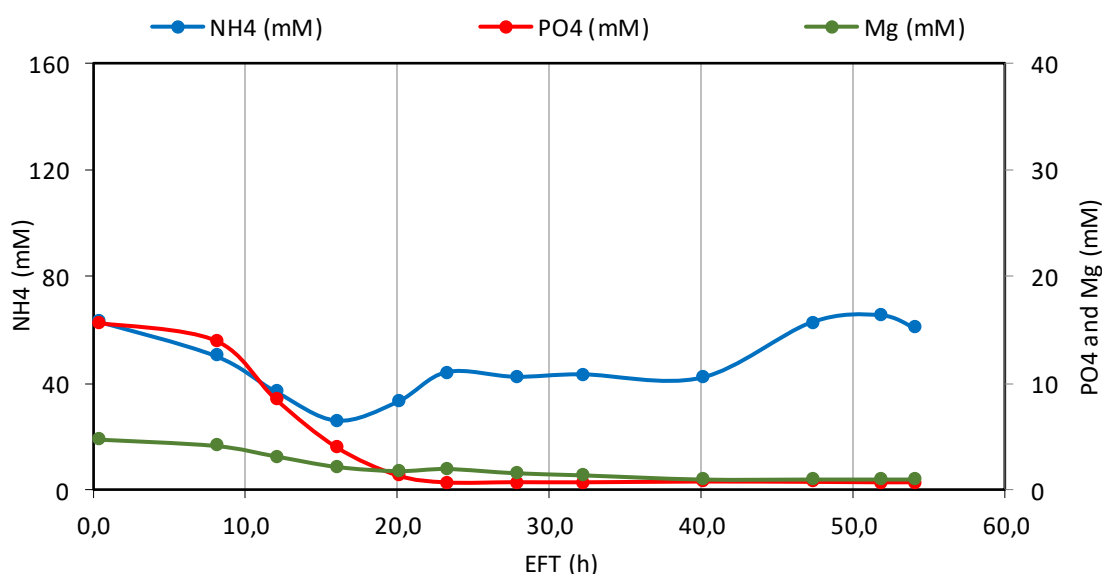


Figura 21 – Concentração de amónia, fosfato e magnésio ao longo da fermentação FERM-2

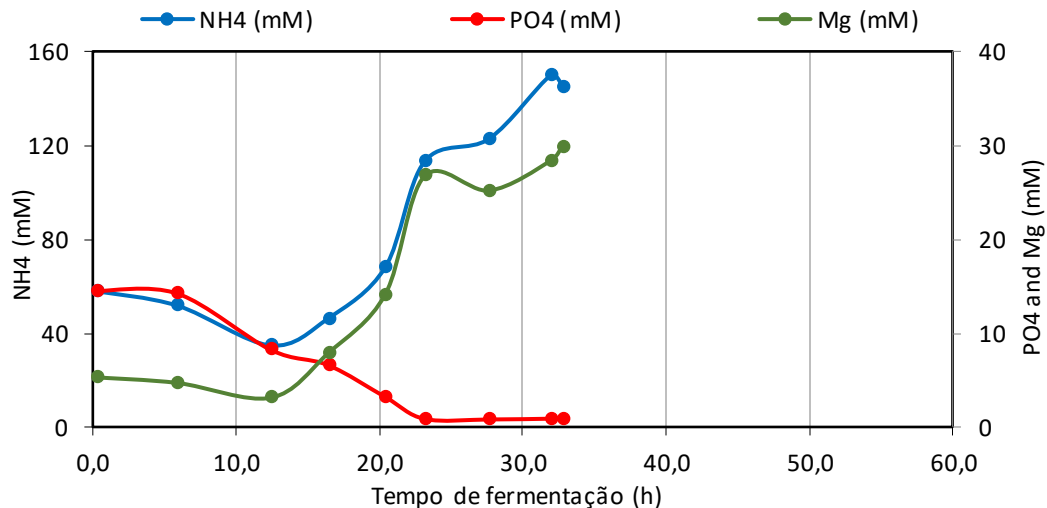


Figura 22 – Evolução da concentração de amónia (NH<sub>4</sub>), fosfato (PO<sub>4</sub>) e magnésio (mg) ao longo da fermentação FERM-3

Analisando os dados adquiridos em linha, verificou-se que a estratégia de adição de alimentação funcionou, resultando na adição apenas quando a concentração de manitol chegou a zero (Figura 23 e Figura 24). Quando a taxa metabólica do microrganismo desce devido ao défice de algum nutriente a concentração de oxigénio dissolvido na cultura aumenta resultando no decréscimo da agitação, de forma a manter constante a saturação em oxigénio definida. Assim, sempre que foi detetado esta queda na agitação foi acionada a bomba de adição de alimentação de forma a colmatar o défice de nutrientes, neste caso fonte de carbono.

No caso da fermentação FERM-2 verificou-se que mesmo existindo fonte de carbono a taxa de agitação diminuiu a partir das 20 horas de fermentação muito possivelmente devido à falta de magnésio (Figura 22). Já na fermentação FERM-3, é possível observar por volta das 22 h duas quedas seguidas na agitação pois o extrato de cogumelo continha glucose para além do manitol o que resulta numa queda quando se esgota a glucose e outra quando se esgota o manitol.

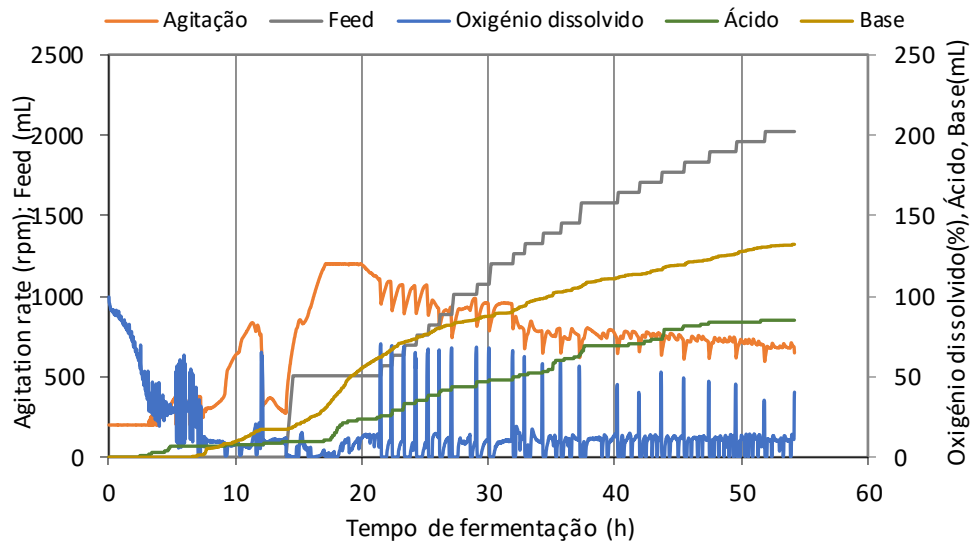


Figura 23 - Registos de dados adquiridos em linha para a FERM-2

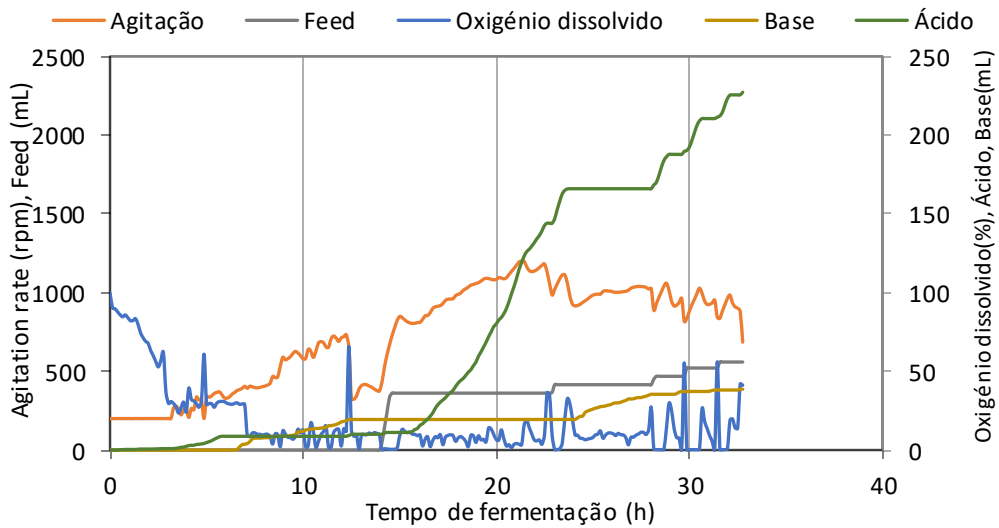


Figura 24 - Registo de dados adquiridos em linha para a FERM-3

## 5. Conclusões

Os ensaios de crescimento em balão permitiram concluir que o microrganismo *P. sacchari* consegue crescer e produzir PHB utilizando como fonte de carbono o hidrolisado de cogumelo, principalmente se este estiver concentrado e destoxificado. A etapa de concentração do hidrolisado permitiu aumentar a concentração de açúcares disponíveis, e a destoxificação permitiu diminuir a concentração de compostos inibidores de crescimento tais como o furfural, assim como diminuir a concentração de fosfato, essencial para desencadear a acumulação significativa de PHB. Contudo, embora se tenha provado a capacidade de crescimento e produção de PHB usando o hidrolisado de cogumelo como fonte de carbono, estas concentrações foram bastante baixas o que permite concluir que para que se possa usar o hidrolisado de cogumelo como fonte de carbono é essencial proceder à concentração e destoxificação do mesmo. Além disso, os resultados parecem indicar que o manitol permite obter melhor crescimento que em glucose, quando apenas açúcares comerciais são usados, contudo a diferença não é significativa.

Nos ensaios de crescimento em balão em que se utilizou como meio de cultura o extrato de pó de cogumelo não houve crescimento. O mesmo não se verificou em meios suplementados o que permite concluir que o extrato do pó de cogumelo, embora contenha uma concentração significativa de açúcares, tem défice de outros componentes importantes ao crescimento da *P. sacchari* tais como azoto (orgânico e inorgânico) e magnésio. Isto é bem visível na curva de crescimento do meio M6 que, embora tivesse uma concentração de manitol mais baixa, continha todos os componentes acima referidos, o que resultou numa densidade ótica maior. Assim, provou-se que o extrato de pó de cogumelo constitui uma fonte de carbono alternativa aos açúcares comerciais, desde que outros componentes essenciais ao crescimento microbiano estejam presentes.

A análise dos resultados obtidos em bioreator do ensaio FERM-1 permitiu verificar que a disponibilidade de açúcares bem como as fontes de azoto, fosfato e magnésio foram garantidas permitindo o crescimento do microrganismo. Por outro lado, não tendo esgotado o fosfato, a produção de PHB foi limitada. Tanto a produção de biomassa como de PHB foi baixa, o que resultou não só do volume disponível de hidrolisado ser reduzido como a concentração de açúcares totais ser baixa, afectando negativamente a produtividade do processo.



Nos ensaios FERM-2 e FERM-3, em que a fonte de carbono principal foi manitol, a amónia nunca se tornou limitante tendo até aumentado ao longo da fermentação FERM-3, devendo-se este aumento à adição de solução de alimentação, que contém amónia. Assim, em ensaios futuros, o controlo de pH deverá ser feito com NaOH como base, evitando acumulação de amónia para níveis eventualmente inibidores de crescimento. Por outro lado, a concentração de magnésio baixou substancialmente na fermentação FERM-2, podendo ter influenciado negativamente a capacidade de crescimento da cultura. Assim, em ensaios futuros propõe-se aumentar a concentração inicial de magnésio. Na FERM-3 aparentemente há acumulação de magnésio, mas não sendo o método de quantificação específico, sendo quantificados outros catiões divalentes, provavelmente o aumento verificado corresponde ao cálcio, adicionado no processo de destoxificação.

Analisando os dados de análise em linha, verificou-se que a estratégia da adição da corrente de alimentação funcionou. Ou seja, sempre que o micorganismo sentiu falta da fonte de carbono (concentração de manitol foi zero) a concentração de oxigénio dissolvido aumentou e conseqüentemente a agitação diminuiu levando a uma nova adição de alimentação. No caso da fermentação FERM-2 verificou-se que, mesmo existindo fonte de carbono, a taxa de agitação diminuiu a partir das 20 horas de fermentação muito possivelmente devido à falta de magnésio. Já na fermentação FERM-3, é possível observar duas quedas seguidas na agitação pois o extrato de cogumelo continha glucose para além do manitol o que resulta numa queda quando se esgota a glucose seguida de outra quando se esgota o manitol.

Em suma, pode concluir-se que tanto o hidrolisado de cogumelo como o extrato de pó de cogumelo podem ser usados como fonte de carbono para o crescimento de *P. sacchari* e produção de PHB sendo que o extrato de pó de cogumelo revelou-se uma melhor opção. Nos ensaios com extrato de pó de cogumelo foi possível obter crescimentos celulares superiores e maior produção de PHB, existindo potencial para melhoria, desde que mais volume de extracto concentrado possa ser produzido. Em futuros ensaios sugere-se a utilização de extrato de pó de cogumelo previamente concentrado por métodos mais eficientes pois, embora a extração do manitol se tenha revelado bastante eficiente apenas com tratamento térmico, todo o processo de clarificação e concentração do extrato foi muito demorado, dispendioso e com baixo rendimento, tendo-se obtido apenas 500 mL de extrato a partir de

12 L de suspensão de pó de cogumelo. Prevê-se que tais limitações possam ser ultrapassadas através da utilização de equipamento a maior escala e de prensagem dos sólidos.

Em conclusão, percebeu-se que a utilização de resíduos de cogumelos para a produção de um bioplástico biodegradável é possível. No entanto, é um processo que ainda tem muito a melhorar nomeadamente na otimização dos processos de extração de fontes de carbono. Ambiciona-se que no futuro o caminho seja uma economia circular e sustentável em que os resíduos deste produto alimentar possam ser utilizados como matéria prima para a produção de um plástico utilizável, por exemplo, na própria embalagem. É importante que continue a haver um investimento na otimização destes processos para torná-los economicamente viáveis e podermos diminuir cada vez mais o nosso impacto ambiental.

## Referências bibliográficas

- Bio-based Industries Joint Undertaking. (2019). *BIOrescue*. <https://biorescue.eu/>
- Biotrend. (2020). *Biotrend - Biotrend*. <http://www.biotrend.pt/>
- Câmara, B. (2010). *HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência | Biomedicina Padrão*. <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2015/04/hplc-cromatografia-liquida-de-alta.html>
- Cesário, M. T., Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M. D., van Keulen, F., Ferreira, B. S., & da Fonseca, M. M. R. (2014). Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.004>
- Da Silva, L. F., Gomez, J. G. C., Rocha, R. C. S., Taciro, M. K., & Pradella, J. G. D. C. (2007). Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, 30(7), 1732–1743. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000700040>
- EAG, laboratories. (n.d.). *Cromatografia Líquida de Alta Performance | HPLC | Laboratórios EAG*. Retrieved April 2, 2020, from <https://www.eag.com/pt/techniques/chromatography/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- Figueiredo, T. V. B., Campos, M. I., Sousa, L. S., Da Silva, J. R., & Druzian, J. I. (2014). PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA BRUTA RESIDUAL DO BIODIESEL. *Quim. Nova*, 37(7), 1111–1117. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140183>
- Funguschain Project. (2017). *Funguschain Project - Extracting value from the agricultural offcuts of commercial mushroom farming*. <https://funguschain.eu/>
- Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*, 10(4), 670–676. <https://doi.org/10.1021/bm8013796>
- Lima, C. (2014). *O problema da poluição do plástico e a necessidade de adotar hábitos mais sustentáveis | Opinião | PÚBLICO*. <https://www.publico.pt/2014/07/12/economia/opiniao/o-problema-da-poluicao-do->

plastico-e-a-necessidade-de-adotar-habitos-mais-sustentaveis-1662651

- Nitzke, J. A., & Biedrzycki, A. (n.d.). *Medida de Crescimento dos Microrganismos*. Retrieved April 2, 2020, from [http://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fermentacao/fer\\_crescimento\\_quantificacao.htm](http://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fermentacao/fer_crescimento_quantificacao.htm)
- Shrivastav, A., Kim, H. Y., & Kim, Y. R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International*, 2013(Mcl). <https://doi.org/10.1155/2013/581684>
- Stuppiello, B. (2016, October 31). *Benefícios dos cogumelos para a sua saúde | Minha Vida*. <https://www.minhavidade.com.br/alimentacao/galerias/17155-beneficios-dos-cogumelos-para-a-sua-saude>
- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *J. Validation Techn*, 17(1), 46–49. [http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT\\_2011\\_v17n1\\_Measurement-of-Microbial-Cells-by-Optical-Density.pdf](http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT_2011_v17n1_Measurement-of-Microbial-Cells-by-Optical-Density.pdf)
- Wu, H. A., Sheu, D. S., & Lee, C. Y. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 53(1), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00232-4)
- WWF. (2018, June 19). *The lifecycle of plastics – WWF-Australia - WWF-Australia*. <https://www.wwf.org.au/news/blogs/the-lifecycle-of-plastics#gs.1tqv8p>

## Anexos

### Anexo I - Soluções para determinação de sais

**Ácido sulfúrico 5N:** Adicionou-se 70 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98% a 430 ml de água Milli-Q num balão de Erlenmeyer em agitação. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente.

**Solução de tartarato de óxido de antimónio (III) de potássio:** Dissolver 1,372 g de tartarato de óxido de antimónio (III) de potássio tri-hidratado ( $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) em água Milli-Q e perfazer o volume de um balão volumétrico de 250 ml. Armazenar à temperatura de 4°C

**Solução de molibdato de amónio:** Dissolver 10 g molibdato de amónio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em água Milli-Q e perfazer o volume de um balão volumétrico de 250 ml. Armazenar à temperatura ambiente.

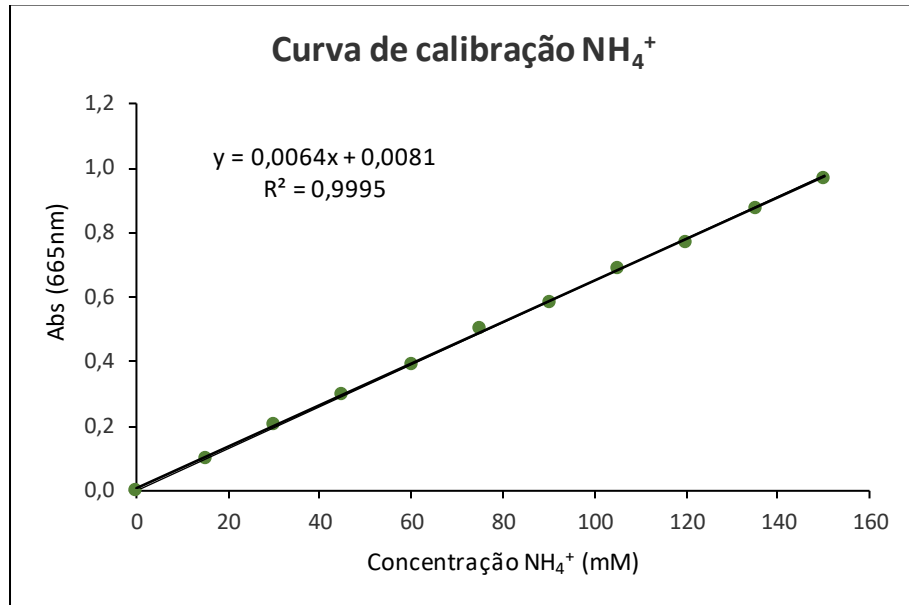
**Solução de ácido ascórbico 0,1 M:** Dissolver 0,88g de ácido ascórbico em 50 ml de água Milli-Q. A solução é estável durante cerca de 1 semana a 4°C.

**Reagente combinado:** Misturou-se num balão de Erlenmeyer de 100 ml, os reagentes acima referidos e à temperatura ambiente, nas seguintes proporções e pela ordem apresentada (o reagente é estável durante 4h):

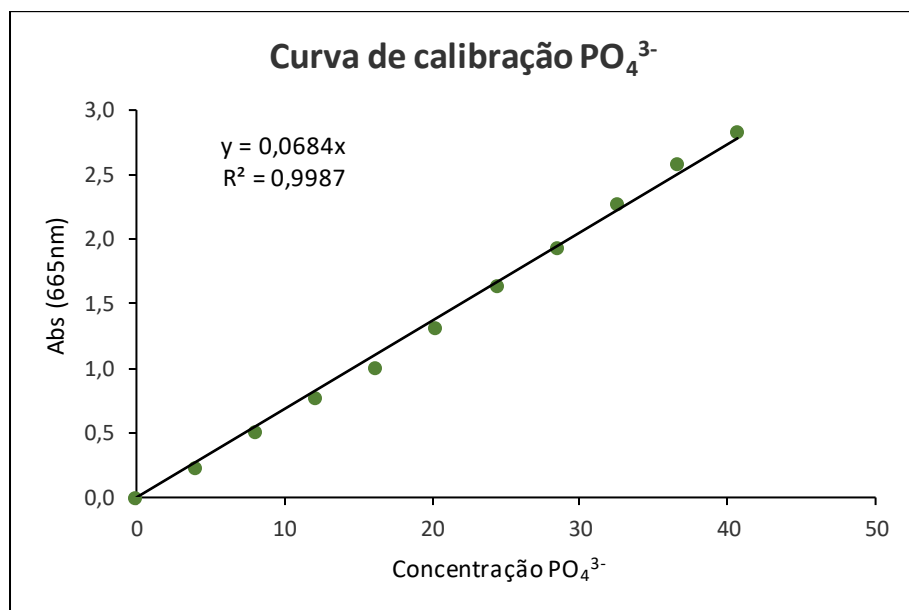
- 25 ml ácido sulfúrico 5N;
- 2,5 ml solução de de óxido de antimónio (III) de potássio;
- 7,5 ml solução de molibdato de amónio
- 15 ml solução de ácido ascórbico 0,1 M

### Anexo II - Curvas de calibração de sais inorgânicos

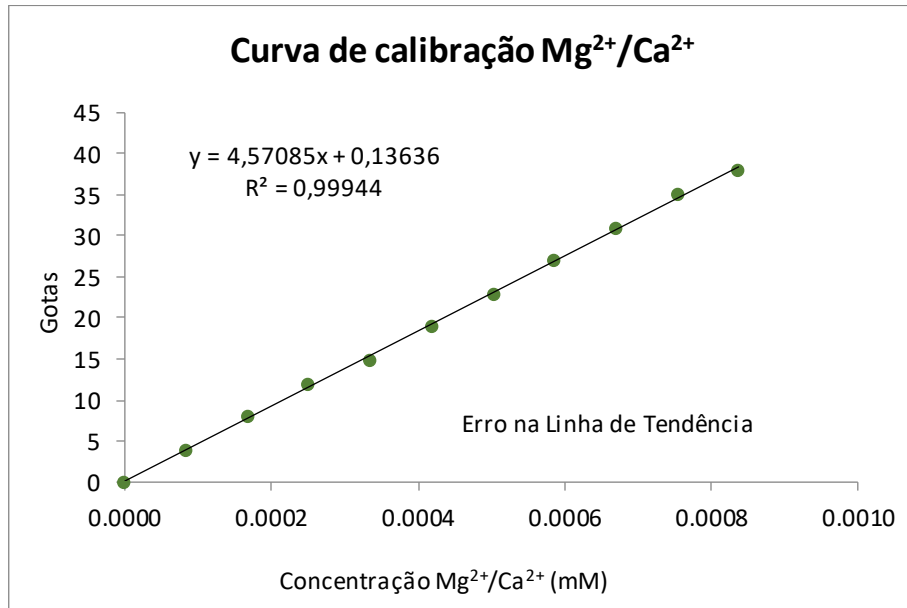
**Solução mãe -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  75 mM**



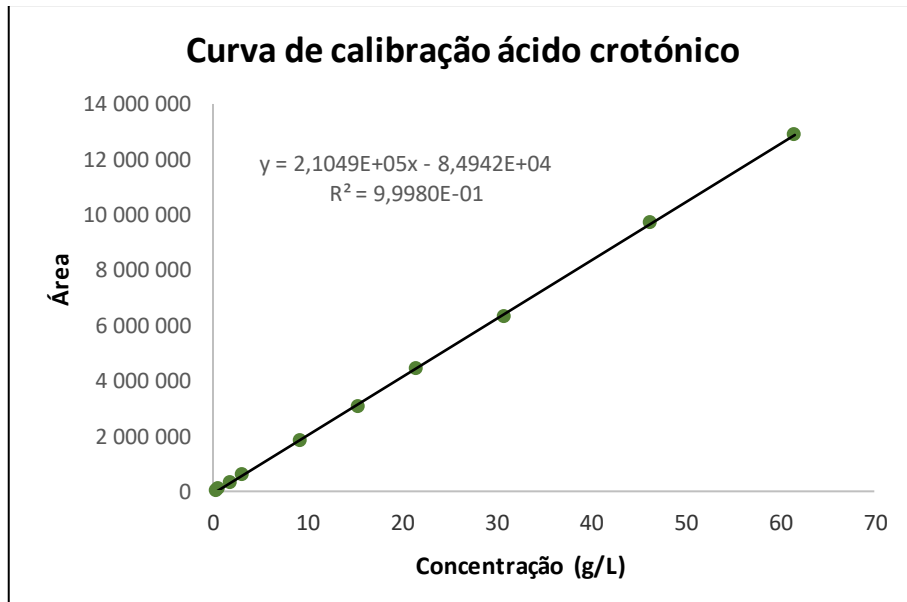
Solução mãe –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM



Solução mãe – MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8mM



Anexo III - Curvas de calibração para o PHB (ácido crotónico)



**Anexo IV - Registo das densidades óticas obtidas a 600 nm no ensaio de crescimento com hidrolisado de cogumelo**

OD	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8
Hora	17:45	9:45	13:40	17:00	10:25	14:00	17:30	10:00
Temp. Ferm.	0.25	16.25	20.17	23.50	40.92	44.50	48.00	64.50
M1	0.070	0.273	0.262	0.548	11.686	13.821	17.553	30.374
M2	0.087	4.624	8.729	12.067	30.960	33.494	35.614	39.234
M3	0.078	8.568	14.667	17.503	21.671	22.143	22.949	22.734
M4	0.092	8.750	14.832	20.045	28.574	28.167	29.972	33.006
M5	0.078	9.011	15.632	20.281	26.126	26.719	28.074	30.756
M6	0.255	7.244	11.277	16.235	31.024	35.403	44.577	49.159

**Anexo V - Registo das densidades óticas obtidas a 600 nm no ensaio de crescimento com extrato de pó de cogumelo**

OD										
Hora	10:45	14:25	17:00	10:00	14:00	10:30	16:30	10:00	14:05	17:15
Temp. Ferm.	0.25	3.92	6.50	16.00	20.00	24.00	30.00	40.00	44.08	47.25
M1	0.100	0.130	0.150	0.223	0.266	0.650	0.821	0.355	0.372	
M2	0.099	0.095	0.127	0.181	0.221	0.262	0.277	0.313	0.341	
M3	0.093	0.131	0.375	6.456	8.858	12.084	11.290	10.742	10.343	10.599
M4	0.068	0.093	0.332	6.894	9.056	12.121	11.395	10.734	10.466	10.338
M5	0.105	0.129	0.416	7.146	9.515	12.689	11.718	11.648	11.140	10.934
M6	0.091	0.209	1.001	8.037	9.672	10.183	11.845	15.832	16.000	
M7	0.100	0.105	0.157	5.971	8.408	11.5615	14.088	13.6375	12.65	

OD										
Hora	10:30	11:50	16:30	17:00	10:00	14:00	10:30	14:30	10:00	10:30
Temp. Ferm.	48.00	49.33	54.00	54.50	64.00	68.00	72.00	76.00	88.00	96.00
M1	1.124		1.041		0.609		0.967			
M2	0.332		0.327		0.470		0.364			
M3	10.361		9.988	9.504			9.863			
M4	10.561		10.202	9.983			10.137			
M5	10.715		10.323	10.425			10.524			
M6	15.649	14.627	17.070		21.098	22.105	24.958	27.177	8.793	33.498
M7	13.16		12.65		12.00		13.50			



## Anexo VI - Registo da concentração de sais, peso seco, PHB ao longo do ensaio em bioreator

### 1. Ferm - 1

Amostra	Tempo de fermentação (h)	OD	Sacrose (g/L)	Glucose (g/L)	Manitol (g/L)	PO4 (mM)	NH4 (mM)	Mg (mM)	peso seco (g/L)	PHB (g/L)
0		0.002	20.14	1.08	0.00	12.06	51.95	3.50		
1	0.25	0.80	19.29	1.39	0.00	14.39	56.19	4.10	0.00	0.11
2	2.00	1.13	17.29	2.37	0.00	13.15	49.57	3.50	0.00	0.12
3	4.33	2.58	11.42	4.80	0.00	11.72	45.65	2.91	0.20	0.13
4	5.83	7.06	6.24	7.94	0.00	10.49	34.03	2.91	1.40	0.17
5	7.83	20.32	2.28	7.40	0.00	9.83	35.34	2.91	4.70	0.54
6	8.28	22.04	2.13	12.78	1.77	6.88	30.11	4.10	4.90	0.61
7	12.83	18.64	2.29	13.70	4.48	3.32	32.11	7.64	10.00	0.86
8	16.83	53.84	2.79	0.69	0.14	1.29	21.03	7.64	17.40	0.69
9	20.83	49.12	2.72	0.00	0.00	0.84	28.26	7.64	17.70	0.51
10	23.33	47.42	0.00	0.00	0.00	0.76	31.88	7.64	18.00	0.50

### 2. Ferm - 2

Amostra	Tempo de fermentação (h)	OD	Glucose (g/L)	Manitol (g/L)	PO4 (mM)	NH4 (mM)	Mg (mM)	peso seco (g/L)	PHB (g/L)
0		0.000	0.00	20.59					
1	0.33	0.63	0.38	20.14	15.62	62.95	4.69	0.00	
2	2.00	0.87	0.34	20.23				0.00	
3	4.00	1.87	0.23	20.19				0.50	
4	6.00	4.46	0.00	19.73				1.30	
5	8.00	8.50	0.00	17.22	14.00	50.19	4.10	1.60	0.22
6	12.00	18.51	0.00	6.04	8.46	36.72	3.11	4.90	
7	16.00	20.44	0.00	35.44	3.97	25.88	2.13	6.20	
8	20.00	69.52	0.00	24.34	1.35	32.88	1.73	18.90	4.33
9	23.25	144.01	0.00	0.18	0.68	44.11	1.93	38.50	
10	25.50	163.75	0.00	4.84				42.10	16.67
11	27.75	182.56	0.00	10.98	0.70	42.34	1.53	45.00	
12	30.00	212.01	0.00	0.00				50.90	
13	32.17	220.97	0.00	5.39	0.68	43.26	1.34	52.90	26.89
14	36.00	277.37	0.00	7.70				51.10	
15	40.00	282.75	0.00	1.76	0.76	41.95	0.94	50.40	
16	44.00	301.94	0.00	3.16				52.10	26.83
17	47.25	258.62	0.00	0.35	0.73	62.72	0.94	63.30	
18	49.50	270.70	0.00	0.00				65.80	
19	51.75	258.87	0.00	0.00	0.68	65.49	0.94	68.30	31.84
20	52.00	255.98	0.00	6.43				66.20	
21	54.00	271.99	0.00	0.00	0.69	60.72	0.94	66.00	29.47

### 3. Ferm - 3

Amostra	Tempo de fermentação (h)	OD	Glucose (g/L)	Manitol (g/L)	PO4 (mM)	NH4 (mM)	Mg (mM)	peso seco (g/L)	PHB (g/L)
0		0.00	0.00	20.41					
1	0.25	0.70	0.31	20.18	14.48	57.80	5.28	0.00	
2	1.92	0.90	0.27	20.35				0.00	
3	3.92	1.85	0.00	20.19				0.50	
4	5.92	4.60	0.00	19.63	14.19	51.65	4.69	1.30	0.13
5	7.92	8.50	0.00	16.49				2.20	
6	12.42	16.38	0.00	5.56	8.21	34.72	3.11	4.90	
7	16.42	22.24	0.58	9.59	6.59	46.19	7.84	6.50	
8	20.42	24.32	1.03	26.61	3.18	68.11	14.14	6.20	0.41
9	23.17	75.20	0.30	26.42	0.85	113.19	26.75	21.60	1.29
10	25.42	88.90	0.00	14.11				26.10	
11	27.67	108.03	0.00	2.36	0.80	122.80	25.17	32.50	1.96
12	29.92	117.85	0.31	5.78				33.70	
13	31.92	130.57	0.00	2.44	0.88	149.57	28.32	35.10	
14	32.77	123.02	0.00	0.00	0.88	145.11	29.90	37.30	3.01

#### Anexo VII - Outras Soluções

##### 1. Solução de oligonutrientes

Volume total preparado: 1000 ml

Componente	Concentração (g/L or mL/L)	Quantidade a medir (g or mL)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10	10,000
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,25	2,250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1	1,000
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,379	0,379
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2	2,000
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	0,23	0,230
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,106	0,106
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.		
H <sub>2</sub> O	Acertar o voume num balão volumétrico.	

##### 2. Solução de PO<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub>

Volume total preparado: 500 mL

Componente	Concentração (g/L)	Quantidade a pesar (g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	45	22.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	7.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	5