

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus*  
*sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa**

**FERNANDA GRISON CONFORTIN**

**Caxias do Sul**

**2006**

**FERNANDA GRISON CONFORTIN**

**Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus*  
*sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon**

**Caxias do Sul**

**2006**

*À minha família, pelo apoio constante  
e ao meu querido Julio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, especialmente ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, pelo carinho, dedicação e acompanhamento pontual e competente com que dirigiu esta dissertação.

À Profa. Dra. Mirian Salvador, pela sua experiência ímpar e exemplo de profissionalismo, assim como a toda sua equipe.

Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira, pelo seu trabalho e competência.

À Rosane Marchetto, pela dedicação e trabalho realizado.

Aos amigos, colegas e companheiros de laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

A Deus, que sempre esteve ao meu lado.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ANEXOS	iii
NOMENCLATURA	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Características gerais do gênero <i>Pleurotus</i>	3
2.2 Composição nutricional de <i>Pleurotus</i> spp. produzido em cultivos sólido e submerso	5
2.3 Formas de cultivo de cogumelos comestíveis	8
2.4 Necessidades nutricionais para produção de biomassa micelial em cultivo submerso	11
2.4.1 Fontes de carbono	11
2.4.2 Fontes de nitrogênio	13
2.4.3 Razão carbono e nitrogênio	15
2.4.4 Fontes de lipídio	16
2.4.5 Minerais e vitaminas	18
2.5 Influência de temperatura, pH, frequências de agitação e aeração e modelo de biorreator sobre o cultivo submerso de micélio fúngico	20
2.6 Polissacarídeos	24
2.6.1 Efeitos de polissacarídeos produzidos por cogumelos	25
2.6.2 Produção de polissacarídeos de micélio fúngico	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Linhagem	29

3.2 Meios de cultivo	29
3.2.1 Solução mineral	29
3.2.2 Meio utilizado para inóculo e controle de contaminação	30
3.2.3 Meios de cultivo utilizados nos ensaios em agitador de bancada	30
3.2.3.1 Meios de cultivo contendo glicose, frutose ou sacarose como fontes de carbono	30
3.2.3.2 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de glicose	30
3.2.3.3 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de óleo de soja e de solução mineral	31
3.2.3.4 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de proteína de soja e de extrato de levedura Prodex <sup>®</sup>	31
3.3 Otimização das concentrações de proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio em frascos agitados	31
3.4 Condições de cultivo para o crescimento do micélio em frascos agitados	35
3.5 Condições de cultivo para o crescimento do micélio em biorreator	36
3.6 Procedimentos analíticos	38
3.6.1 Determinação de pH e açúcares redutores totais	38
3.6.2 Quantificação do micélio	39
3.6.3 Análise da composição centesimal do micélio	39
3.6.4 Quantificação de exopolissacarídeos	40
3.6.5 Preparação do extrato etanólico bruto do micélio	40
3.6.6 Preparação do extrato bruto dos exopolissacarídeos	40
3.6.6 Avaliação da capacidade antioxidante de extratos do micélio	41
3.7 Cálculos dos fatores de conversão do substrato em biomassa, rendimento e produtividade	41
3.7.1 Fator de conversão do substrato em biomassa	41
3.7.2 Rendimento em biomassa	42
3.7.3 Produtividade	42
3.8 Análises estatísticas	43

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Determinação da fonte de carbono para a produção de biomassa micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em cultura submersa	44
4.2 Produção de biomassa fúngica com diferentes concentrações de glicose	47
4.3 Influência de óleo de soja e da solução de sais na produção de biomassa micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	54
4.4 Produção de biomassa de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em cultivo submerso com diferentes concentrações de extrato de levedura Prodex® e de proteína de soja	55
4.5 Produção de biomassa de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em cultivos submersos combinando proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio	56
4.6 Otimização das concentrações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio no meio de cultivo submerso de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	57
4.7 Produção de biomassa fúngica de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em biorreator de bancada	61
4.8 Custos de produção da proteína fúngica	68
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corpo de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	3
Figura 2. Biorreator utilizado no cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	37
Figura 3. Biomassa micelial em 96 horas de cultivos submersos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 com diferentes fontes de carbono, com e sem a presença de óleo de soja.	45
Figura 4. Biomassa micelial e consumo de substrato durante o cultivo submerso de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes concentrações de glicose.	49
Figura 5. Biomassa micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 durante o cultivo submerso em diferentes concentrações de glicose.	49
Figura 6. Valores máximos de conversão de substrato em biomassa micelial ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	50
Figura 7. Valores máximos de rendimento de biomassa micelial em função da concentração inicial de substrato e <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	51
Figura 8. Produtividade em biomassa micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	53
Figura 9. Biomassa micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em cultivos submersos com variação da concentração de óleo de soja e de solução de sais.	54
Figura 10. Biomassa micelial durante o cultivo submerso de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 com variação nas concentrações de extrato de levedura Prodex <sup>®</sup> e de proteína de soja.	56
Figura 11. Produção de biomassa fúngica de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 a partir da variação nas concentrações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex <sup>®</sup> e sulfato de amônio no meio de cultivo.	57
Figura 12. Produção de biomassa micelial da linhagem PS-2001 de <i>Pleurotus sajor-caju</i> nos meios otimizados.	60
Figura 13. Biomassa micelial e açúcares redutores totais durante cultivo submerso de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em biorreator.	62
Figura 14. Biomassa micelial e consumo de substrato durante cultivo submerso de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em biorreator com meio otimizado.	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Plano fatorial básico do experimento.	32
Tabela 2. Cálculo dos coeficientes para variáveis (CV) A*, B* e C*.	32
Tabela 3. Coeficiente das variáveis X unidade de variação.	33
Tabela 4. Nova série dos meios experimentais para otimização.	35
Tabela 5. Açúcares redutores totais ( $\text{g.L}^{-1}$ ) após 96 horas de cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	46
Tabela 6. Rendimento de biomassa em relação à concentração inicial de substrato ( $\text{g.g}^{-1}$ ).	51
Tabela 7. Valores médios de biomassa fúngica ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtidos de acordo com a variação no meio de cultura das concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio.	58
Tabela 8. Formulação dos tratamentos para a otimização do cultivo.	60
Tabela 9. Composição química do micélio de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.	64
Tabela 10. Composição de proteínas do corpo de frutificação X valor comercial da proteína fúngica.	69
Tabela 11. Análise dos custos parciais e potencial de produção em reais de micélio de <i>Pleurotus sajor-caju</i> produzido em cultivo submerso.	70

## NOMENCLATURA

C/N – Razão carbono / nitrogênio

CV – Coeficiente de variáveis

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNS – Ácido dinitrosalicílico

DP – Desvio padrão

DPPH• – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EL – Extrato de levedura

EPS – Exopolissacarídeos

MP – Meio de manutenção da linhagem

MS – Solução mineral

OS – Óleo de soja

P – Produto

P\* - Produto da soma dos valores de biomassa correspondente aos tratamentos compostos pelas variáveis em níveis de +1 biomassa; subtraído pela soma dos valores de biomassa correspondente aos tratamentos compostos pelas variáveis em níveis de -1 biomassa.

PS – Proteína de soja

$P_x$  – Produtividade de substrato em biomassa em função do tempo ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

q.s.p. 1L – Quantidade suficiente para 1 litro

SA – Sulfato de amônio

Sf – Substrato final ( $\text{g.L}^{-1}$ )

Si – Substrato inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )

t – Tempo de fermentação

UV – Unidade de variação

Vb – Valores de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

vvm – Volume de ar (L) por volume de meio (L) por minuto

Xf – Biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ )

Xi – Biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$Y_{r/s}$  – Fator de rendimento de substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$Y_{x/s}$  – Fator de conversão de substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ )

## RESUMO

Neste trabalho, formularam-se diferentes meios de cultivo para a produção econômica de biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso, visando o emprego do micélio na alimentação humana. Foram testadas glicose, frutose e sacarose como fontes de carbono, assim como diferentes concentrações de glicose, óleo de soja, solução de sais, extrato de levedura Prodex<sup>®</sup>, proteína de soja e sulfato de amônio. Estudos realizados em frascos agitados mostraram que 10g.L<sup>-1</sup> de glicose promoveram a maior biomassa micelial (5,98g.L<sup>-1</sup>) e a melhor produtividade (0,048g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). A adição de 1mL.L<sup>-1</sup> de óleo de soja ao meio de cultivo mostrou ser favorável ao crescimento fúngico, também resultando na presença do aroma típico de corpos de frutificação. Os resultados de otimização do meio de cultivo mostraram que proteína de soja (2,3g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (1,86g.L<sup>-1</sup>) e sulfato de amônio (1,57g.L<sup>-1</sup>) também favoreceram o crescimento. Estudos realizados em biorreator de bancada, utilizando o meio otimizado e nas condições testadas (temperatura de 28°C, frequência do agitador de 100rpm, taxa de aeração de 0,5vvm, O<sub>2</sub> dissolvido acima de 30% da saturação), quando comparados aos resultados obtidos em frascos agitados com o mesmo meio, mostraram valores de biomassa, rendimento e produtividade superiores (8,18g.L<sup>-1</sup>, 0,82g.g<sup>-1</sup> e 0,08g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente). Ao comparar os principais componentes do micélio seco de *P. sajor-caju* PS-2001, obtidos no presente trabalho, com o do corpo de frutificação da mesma linhagem, cultivado em serragem de eucalipto, observaram-se semelhanças na composição química com relação ao percentual de carboidratos totais, proteína bruta e minerais; no entanto, os conteúdos de lipídios brutos e de calorias mostraram-se maiores no micélio. O consumo total de sacarose na presença de óleo de soja foi evidenciado quando o cultivo foi realizado em biorreator, o que não ocorreu em frascos agitados. Ao comparar os resultados dos cultivos variando as fontes de carbono (glicose e sacarose) em biorreator, observaram-se maiores valores de biomassa, rendimento e produtividade com glicose. A determinação dos valores de exopolissacarídeos (EPS) correspondeu a 1,18 e 1,58g de matéria seca.L<sup>-1</sup> após 120h e 144h, para glicose e sacarose, respectivamente. Os resultados mostraram ausência de atividade antioxidante *in vitro* dos EPS e do extrato bruto do micélio, avaliadas através da capacidade de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>). Verificou-se que, para produzir 1kg de micélio seco, utiliza-se 1,69kg de sacarose, a um custo de R\$1,63, sendo o valor de kw.h<sup>-1</sup> consumido de R\$1,26, totalizando R\$2,89, não computados os custos de mão de obra e de secagem; entretanto, o valor de mercado para 1kg de cogumelo seco é de R\$200,00.

## ABSTRACT

In this study, different growth media for the economic production of biomass of *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in submerged process were formulated, aiming the use of mycelium in human feeding. Glucose, fructose and sucrose as carbon sources, as well as different concentrations of glucose, soy oil, salt solution, Prodex<sup>®</sup> yeast extract, soy protein and ammonium sulphate were tested. Studies that were carried out in shaken flasks showed that 10g.L<sup>-1</sup> of glucose led to the larger mycelium biomass (5.98g.L<sup>-1</sup>) and the best productivity (0.048g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). The addition of 1mL.L<sup>-1</sup> of soy oil to the medium was favorable to fungal growth, also resulting in the presence of the typical aroma of the fruiting body. The results achieved in the optimization of the growing medium showed that soy protein (2.3g.L<sup>-1</sup>), yeast extract (1.86g.L<sup>-1</sup>) and ammonium sulphate (1.57g.L<sup>-1</sup>) enhanced the mycelium growth. Studies carried out in laboratory-scale bioreactor, using the optimized medium, under standard conditions (temperature of 28°C, initial impeller speed of 100rpm, initial aeration rate of 0.5vvm, and dissolved oxygen over 30% of saturation), showed superior biomass values, yield, and productivity (8.18g.L<sup>-1</sup>, 0.82g.g<sup>-1</sup> and 0.08g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectively) when compared to the results obtained in shaken flasks with the same medium. By comparing the composition of the dry mycelium of *P. sajor-caju* PS-2001 obtained in this study with the fruiting body of the same strain, grown on eucalyptus sawdust, similarities in the chemical composition regarding the total carbohydrate percentual, crude protein and minerals were observed. However, the contents of crude lipids and calories were higher in the mycelium. The total consumption of sucrose in the presence of soy oil was evidenced when growth was carried out in bioreactor, which did not occurred in shaken flasks. When comparing the results of cultivation on media containing glucose and sucrose in bioreactor, superior values of biomass concentration, yield and productivity with glucose were observed. With media containing glucose and sucrose, exopolysaccharide (EPS) values of 1.18 and 1.58g of dry material.L<sup>-1</sup>, after 120h and 144h, respectively, were observed. No *in vitro* antioxidant activity of both EPS and mycelium crude extract was detected when these materials were evaluated with respect to their capacity of reducing the free radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>). It was calculated that, to produce 1kg of dry mycelium, it is used 1.69kg of sucrose, costing R\$1,63, being the value of kw.h<sup>-1</sup> consumed of R\$1,26, totaling R\$2,89, not being computed the labor and drying costs; however, the market value for 1kg of dry mushroom is R\$200,00.

## 1 INTRODUÇÃO

A importância das proteínas na alimentação humana vem chamando a atenção de pesquisadores para a busca de processos de baixo custo que utilizem carboidratos na produção de alimentos ricos neste nutriente. Deste modo, uma alternativa econômica e viável é o uso de microrganismos na conversão de alguns resíduos agrícolas em fontes de alimentos contendo proteínas. Essa prática apresenta algumas vantagens metodológicas e econômicas, tais como o rápido crescimento da biomassa e a possibilidade de utilização de resíduo agroindustrial. Entre os microrganismos com potencial de utilização na alimentação humana estão os cogumelos. Estes fungos são utilizados há milênios e tiveram sua produção aumentada nas últimas décadas.

No Brasil, o consumo de cogumelos comestíveis vem crescendo significativamente, devido ao reconhecimento de seu elevado valor nutricional, por ser uma fonte rica em aminoácidos essenciais e, ao mesmo tempo, ser pobre em gorduras saturadas, gorduras *trans* e colesterol.

Os fatores que ainda limitam a comercialização de cogumelos são decorrentes das dificuldades encontradas em seu cultivo, que resultam em uma baixa produtividade, elevando o preço do produto, assim como hábitos alimentares e crenças populares quanto à sua natureza venenosa. Entretanto, a procura da população por alimentos naturais, sem defensivos agrícolas e com algumas propriedades terapêuticas, tem contribuído para o aumento da demanda de produção de cogumelos comestíveis e medicinais.

No Brasil, são três os principais tipos de cogumelos cultivados: *Agaricus bisporus* (*champignon*), *Lentinula edodes* (*shiitake*) e espécies do gênero *Pleurotus*. O cultivo comercial destes cogumelos geralmente acontece em troncos de árvores ou em meios utilizando materiais agrícolas como substratos.

Uma alternativa para o cultivo de cogumelos é o seu crescimento em meio líquido. Neste processo, biomassa pode ser produzida em tanques com agitação e aeração. Caso o micélio desenvolvido em cultivo líquido apresente as mesmas características nutritivas do corpo de frutificação, torna-se de grande interesse a produção de biomassa de basidiomicetes por este tipo de processo, em razão de algumas vantagens, como: maior uniformidade do produto, maior controle do processo, menor área de produção e maior produtividade.

Com base neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral formular meios de cultivo líquidos para a produção econômica de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* em processo submerso. Os objetivos específicos foram:

- estudar a produção de micélio de *P. sajor-caju* PS-2001 em meios formulados com diferentes concentrações de fontes de carbono, proteína de soja, extrato de levedura bruto de baixo custo Prodex<sup>®</sup>, sulfato de amônio, solução de sais e óleo de soja em cultivo líquido;
- avaliar o micélio obtido em cultivo líquido quanto à composição nutricional a partir de análises físico-químicas;
- quantificar os polissacarídeos solúveis no meio de cultivo após a separação do micélio;
- avaliar o potencial antioxidante de polissacarídeos extracelulares;
- avaliar a capacidade antioxidante do extrato etanólico do micélio seco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais do gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem Agaricales e à família Polyporaceae e pode crescer sobre diferentes substratos lignocelulósicos. Este gênero abrange diversas espécies, todas comestíveis e se caracteriza por conter corpo de frutificação com estipe ligada ao píleo, o qual se abre para cima, semelhante a uma ostra, como mostra a Figura 1, sendo popularmente conhecidos como “cogumelos-ostra” (Putzke & Putzke, 2002).



**Figura 1. Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.**  
(Laboratório de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia-UCS).

Os “cogumelos-ostra” são saprófitos, desenvolvem-se em troncos de madeira, possuem habilidade para degradar resíduos lignocelulósicos, além da capacidade de secretar um amplo espectro de enzimas para oxidação e hidrólise da lignina (Zadrazil, 1984). A partir da decomposição destes resíduos, ocorre a produção de basidiomas de elevada qualidade organoléptica, com aplicações como alimento nutritivo, suplemento protéico ou fonte de lipídios (Chang & Miles, 1991; Zervakis & Balis, 1996; Maziero *et al.*, 1999).

Segundo Bano & Rajarathnam (1988a), cogumelos *Pleurotus* spp. possuem a vantagem de crescer em uma extensa faixa de temperatura, que varia de 15 a 31°C.

Entretanto, para a maioria dos cogumelos comestíveis, esta temperatura é de aproximadamente 25°C (Bononi *et al.*, 1999).

Exemplares de *P. sajor-caju* foram inicialmente encontrados na base das montanhas do Himalaia, crescendo naturalmente sobre troncos de *Euphorbia reyleana*. Em 1976, esta espécie foi introduzida na Índia, difundindo-se para todo o mundo (Jandaik & Kapoor, 1976).

Existem pelo menos 12.000 espécies de fungos considerados cogumelos e, destes, aproximadamente 2.000 apresentam vários graus de comestibilidade (Chang, 1999a). Mundialmente, apenas 35 espécies de cogumelos são cultivadas comercialmente, sendo que somente 20 são produzidas em escala industrial. A produção mundial de cogumelos comestíveis, em 1994, foi de  $4,9 \times 10^3$  toneladas, aumentando para  $6,2 \times 10^3$  em 1997, com um lucro aproximado de 14 bilhões de dólares. Em 1999, seis espécies de cogumelos representavam 92% do total da produção mundial, sendo elas *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* e *Volvariella volvacea* (Chang, 1999b).

Cogumelos são apreciados e consumidos, há muitos anos, pelos povos orientais. São considerados delicados, por sua textura e cor característica (Zadrazil, 1984; Bisaria *et al.*, 1987), possuem agradável sabor, atrativa composição nutricional, são ricos em proteínas e apresentam propriedades medicinais (Sánchez, 2004).

O gênero *Pleurotus* é um dos grupos de cogumelos mais comercializados no mundo e aproxima-se em importância comercial dos gêneros *Agaricus* e *Lentinula* (Rosado *et al.*, 2003). Segundo Chang (1999b), o cultivo comercial do “cogumelo-ostra” representou 14,2% da produção mundial de cogumelos comestíveis em 1997, ficando abaixo apenas dos cogumelos *A. bisporus* (31,8%) e *L. edodes* (25,4%).

Estudos têm relatado redução dos custos e intensificação da produção de cogumelos comestíveis, inclusive no Brasil (Bononi *et al.*, 1999), sendo de 3.000 toneladas a produção

de *Pleurotus* spp., estimada em 1995 (Sturion & Ranzani, 2000). Entretanto, no Brasil, cogumelos ainda são considerados iguarias na culinária, em consequência de seu elevado custo e mercado limitado (Bononi *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos, a produção de *Pleurotus* spp. aumentou anualmente em 14% durante os cinco anos anteriores a 2002. Este aumento reflete uma tendência internacional de produção que é decorrente da demanda de consumo e, também, do elevado preço do produto, que é superior ao de *A. bisporus* (Royse, 2002). Em outras regiões do mundo com larga escala de produção, seu cultivo é considerado um processo econômico bem sucedido (Wood, 1989).

## **2.2 Composição nutricional de *Pleurotus* spp. produzido em cultivos sólido e submerso**

Comparativamente, a composição centesimal de várias espécies de *Pleurotus* mostra que carboidratos e proteínas representam os maiores componentes, seguidos de minerais. O conteúdo de gordura é pequeno na maioria das linhagens, mas significativamente elevado em *P. limpidu* (Bano & Rajarathnam, 1987).

Segundo Chang *et al.* (1981), as concentrações de tiamina, riboflavina e niacina, presentes no gênero *Pleurotus*, são superiores quando comparadas a valores relatados para os gêneros *Auricularia*, *Lentinus* e *Volvariella*. *P. sajor-caju* apresenta maior quantidade de niacina que outras espécies de cogumelos; no entanto, possuem pequenas quantidades de tiamina e ácido ascórbico (Chang *et al.*, 1981).

Segundo Bano & Rajarathnam (1987), a quantidade de minerais presente no corpo de frutificação de cogumelos do gênero *Pleurotus* representam, aproximadamente, 10% de seu peso seco. Ao analisar o conteúdo de minerais presente no micélio de *P. sajor-caju*, Chahal (1989) observou valores de 2,02% de fósforo, 0,52% de sódio, 0,24% de magnésio, 0,62% de potássio, 0,84% de cálcio, 124ppm de ferro e 29ppm de manganês.

O valor de energia de um alimento pode ser estimado através do seu conteúdo de proteína bruta, lipídio e carboidrato, usando os fatores de conversão de 4; 9,1 e 4,2kcal.g<sup>-1</sup> de cada componente, respectivamente. Visto que estes componentes em cogumelos não são 100% digeridos pelos humanos, fatores de conversão de 2,62; 8,37 e 3,48 são usualmente empregados para corrigir a reduzida digestibilidade de proteína (70%), de lipídio (90%) e de carboidrato (85%) (Bano & Rajarathnam, 1988b). Com base no conteúdo destes nutrientes, o valor de energia fornecido pelo corpo de frutificação de *P. ostreatus* é o equivalente a 345kcal.100g<sup>-1</sup> de micélio seco, o qual é menor quando comparado aos valores de *A. bisporus*, *L. edodes* e *V. volvacea* (381, 392 e 369kcal.100g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Chang, *et al.*, 1981).

Carboidratos representam os maiores constituintes de *Pleurotus* spp., correspondendo a valores que variam de 47 a 82% de seu peso seco. Polímeros de carboidratos, inclusive glicogênio, servem de energia armazenada. A quitina é um componente estrutural da parede do fungo e, também, é considerada a maior constituinte de fibra dos cogumelos (Bano & Rajarathnan, 1988b).

O conteúdo de lipídios em diferentes espécies de *Pleurotus* varia de 1,1% a 9,4% de seu peso seco. Como maior componente do conteúdo total dos lipídios presentes nos cogumelos, têm-se os triacilgliceróis, com 29% de seu peso seco. Em relação à proporção de ácidos graxos, 79,4% correspondem ao ácido oléico, 14,3% ao ácido palmítico e 6,3% ao ácido linoléico (Bano & Rajarathnan, 1988b).

Ácidos ribonucléicos são encontrados em maior quantidade em espécies do gênero *Pleurotus*. O consumo de fontes protéicas com elevado conteúdo de purinas para humanos resulta em elevados níveis plasmáticos de ácido úrico, o que pode favorecer o desenvolvimento de doenças como gota e artrites reumáticas. Desta forma, é recomendado um consumo de até 250g/dia de cogumelo fresco por pessoa (Bano & Rajarathnan, 1988b).

Ao avaliar os constituintes químicos de micélio de *P. ostreatus* produzido em cultura submersa contendo glicose e do corpo de frutificação produzido em resíduo de algodão, Hadar & Cohen-Arazi (1986) encontraram similaridades (percentagem por peso seco) no conteúdo total de nitrogênio (4 e 3,8), proteína (24,3 e 23,3), glicogênio (13,4 e 13,3), ácidos graxos (1,6 e 1,5), RNA (1 e 1,2) e cinzas (6,1 e 5,8) do corpo de frutificação e do micélio em forma de aglomerados, respectivamente. A análise do conteúdo dos constituintes da parede celular do corpo de frutificação e do micélio (percentagem por peso seco) foi a seguinte: nitrogênio (1,3 e 3,1), cinzas (1,9 e 5,4), açúcares totais (64,8 e 50,4), açúcares aminados (4,5 e 3,5) e glicose (49 e 41) (Hadar & Cohen-Arazi, 1986).

Com relação à análise de aminoácidos, constatou-se que o micélio mostrou elevados níveis de ácido aspártico, cisteína, fenilalanina e leucina, enquanto o corpo de frutificação apresentou maiores quantidades de valina e isoleucina. Contudo, ao comparar qualitativa e quantitativamente ambas as estruturas fúngicas, constataram-se grandes similaridades quanto aos seus constituintes químicos (Hadar & Cohen-Arazi, 1986).

Manu-Tawiah & Martin (1987) analisaram a composição química do micélio de *P. ostreatus* cultivado em frascos agitados, em meio sintético baseado em glicose ( $45\text{g.L}^{-1}$ ) e meio complexo baseado em extrato de turfa. Os resultados da biomassa micelial foram comparados com o corpo de frutificação cultivado em meio sólido de turfa. Os dados deste estudo mostraram similaridade entre o micélio cultivado em meio líquido de extrato de turfa e o corpo de frutificação. Entretanto, notáveis diferenças presentes no micélio foram baixa umidade, pequeno conteúdo de cinzas e elevado conteúdo de lipídios. A análise dos aminoácidos presentes no micélio e no corpo de frutificação revelou a presença de dezessete aminoácidos, inclusive todos os essenciais. Entretanto, a quantidade de aminoácidos essenciais presentes no micélio cultivado em extrato de turfa foi maior, quando comparado com as outras duas fontes analisadas. Já, ao comparar os aminoácidos essenciais presentes no

micélio do cogumelo *P. ostreatus* com aqueles encontrados no ovo de galinha, de acordo com as recomendações de aminoácidos da FAO/WHO (1973) para adultos, observou-se que o micélio é deficiente em metionina, mas, ao mesmo tempo, contém elevadas concentrações de lisina e leucina, aminoácidos deficientes em cereais (Manu-Tawiah & Martin, 1987).

### **2.3 Formas de cultivo de cogumelos comestíveis**

A eficiência e a qualidade da biomassa do cogumelo dependem da espécie do fungo e do método utilizado para o crescimento. O cultivo estacionário possibilita a obtenção do corpo de frutificação do cogumelo desejado, e o submerso, desenvolvido em fase líquida, possibilita a obtenção de biomassa micelial (Leonowicz *et al.*, 1990). A técnica de cultivo submerso de cogumelos é mais adequada para favorecer o aumento na produção de substâncias importantes, como agentes nutracêuticos e farmacêuticos, que são extraídos do caldo ou do próprio micélio (Smith *et al.*, 2002).

A forma mais antiga de cultivo é em estado sólido, utilizando como substratos resíduos agroindustriais de maior disponibilidade, possibilitando a produção de corpos de frutificação com fins alimentares, extração de enzimas, extração de princípios terapêuticos e bioconversão de resíduos lignocelulósicos de um modo geral (Thomas *et al.*, 1998). Este método de cultivo é praticado principalmente na Ásia e ocorre sobre troncos de árvores (Smith *et al.*, 2002). Os substratos baseados em resíduos agrícolas mais comumente empregados são palha de cereais, resíduos de papel, banana, espiga de milho, algodão, madeira, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros (Bano & Rajarathnam, 1987).

De acordo com Pettipher (1987), o cultivo de cogumelos em meio sólido, além de fornecer uma fonte de proteínas para o consumo humano, é uma alternativa para agregar valor aos resíduos lignocelulósicos, que se tornam enriquecidos e aptos para uso na nutrição animal.

Silva *et al.* (2002) avaliaram a composição química de diferentes resíduos, utilizados como substratos durante o cultivo de *P. pulmonarius*. Os resultados obtidos após o cultivo do cogumelo mostraram uma diminuição no conteúdo de fibras, o que é próprio da degradação da lignina e da celulose pelo fungo, e um considerável conteúdo de proteína, favorecido pela presença do micélio no resíduo. Desta forma, os valores de proteínas e a degradação de fibras, ocorrida durante o crescimento do fungo, aumentam a digestibilidade destes resíduos, permitindo sua utilização como complemento na alimentação animal.

Em meio líquido, o cultivo de *Pleurotus* spp. pode gerar biomassa com fins alimentares (Martin, 1983) e, também, produzir polissacarídeos com fins medicinais (Burns *et al.*, 1994), como visto para exopolissacarídeos produzidos por outros cogumelos, que possuem empregos farmacológicos e biológicos (Hwang *et al.*, 2003a).

Há mais de quarenta anos, pesquisadores vêm estudando a possibilidade de cultivar micélio em meio líquido. A primeira tentativa de cultivo visou incubar *A. campestris* em meio aquoso, constituído de nutrientes sintéticos (glicose, uréia e alguns minerais), em condição de cultura agitada. Posteriormente, vários substratos têm sido utilizados em culturas submersas para produção de micélio de cogumelos comestíveis (Leonowicz *et al.*, 1990).

Martin (1983) utilizou extrato de turfa (*Sphagnum*) como única fonte de nutriente na produção de *Morchella esculenta*. O rendimento obtido foi de 6,7%, considerado pouco eficiente. A partir deste resultado, concluiu-se que a composição nutricional do extrato de turfa apresentou limitações em alguns nutrientes necessários para o crescimento desta espécie. Rosado *et al.* (2003), objetivando a produção de biomassa de *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus* em cultura submersa, em meio composto por glicose, extrato de levedura, peptona e minerais, obtiveram com *P. ostreatus* 22,8g de peso seco de micélio.L<sup>-1</sup>, após nove dias de incubação.

As técnicas de fermentação submersa são amplamente desenvolvidas para serem aplicadas à maioria dos cogumelos medicinais, para fins de propagação do micélio (Smith *et*

*al.*, 2002). Dentre os estudos realizados, vários deles são restritos ao desenvolvimento de cultivos em frascos agitados, existindo poucos em escala piloto. Entretanto, em qualquer uma das situações, os resultados apontam para elevadas quantidades de biomassa micelial, obtidas em um curto intervalo de tempo, geralmente de quatro a cinco dias (Slomko, 2001).

O cultivo submerso de *Pleurotus* pode ser realizado em larga escala e com baixo custo, pois é considerado um método rápido e alternativo para obtenção de biomassa fúngica com qualidade consistente. Além disso, a razão do crescimento do fungo em meio líquido é freqüentemente elevada, quando comparada com o meio sólido (Martin, 1983), pois a obtenção de inóculo em cultivo líquido permite produzir maior quantidade de biomassa em menor tempo, favorecendo a dispersão e adaptação do fungo (Guillén-Navarro *et al.*, 1998). A grande vantagem do cultivo submerso de *Pleurotus* é a possibilidade de produzi-lo durante o ano todo, independentemente de variações sazonais.

No cultivo líquido de basidiomicetes, o estágio de formação do corpo de frutificação não ocorre, mas a biomassa e os exopolissacarídeos produzidos podem ser recuperados. Além disso, a biomassa produzida pode ser diretamente usada como inóculo em novos processos produtivos, como fonte para produção de metabólitos intermediários, como complemento de alimentos ou alimentos enriquecidos e para extração de aromas e sabores (Maziero *et al.*, 1999; Rosado *et al.*, 2003). Assim, considerando a possibilidade da aplicação biotecnológica dos exopolissacarídeos produzidos por basidiomicetes e os vários empregos do micélio, fica evidente a vantagem comercial da produção em cultura líquida (Rosado *et al.*, 2003).

De acordo com Guillén-Navarro *et al.* (1998), a cultura submersa, comercialmente, é mais vantajosa em função dos seguintes fatores: facilidade de separação do micélio do meio de cultura, ocupação de uma área relativamente pequena para o crescimento do micélio, permite a esterilização do meio de crescimento no biorreator e a manutenção da cultura asséptica e possibilita maior controle das condições de cultivo durante o processo de

fermentação. Por outro lado, o cultivo líquido demanda mais trabalho e energia do que a forma sólida (Leonowicz *et al.*, 1990). Além disso, a proteína resultante da produção do micélio em cultivo líquido, a partir de substratos como carboidratos, pode ser de particular interesse em países em desenvolvimento, onde exista deficiência crônica deste nutriente (Manu-Tawiah & Martin, 1987).

## **2.4 Necessidades nutricionais para produção de biomassa micelial em cultivo submerso**

A tecnologia para o cultivo submerso de cogumelos é inovadora e pouco se conhece sobre os requerimentos nutricionais dos cogumelos em cultura líquida (Yang *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2004). As necessidades nutricionais dos fungos superiores variam entre diferentes espécies e até mesmo entre linhagens da mesma espécie, sendo o rendimento e a qualidade da biomassa dependente da espécie do fungo e da condição de cultivo (Leonowicz *et al.*, 1990).

Martin (1983) testou vários substratos para o crescimento micelial de espécies de *Morchella* em cultura submersa. Em todos os estudos, o valor nutricional, as propriedades e o sabor do cogumelo foram assegurados. Assim, como as necessidades nutricionais do fungo influenciam a razão de crescimento e a qualidade da biomassa, o seu conhecimento constitui um pré-requisito para produção de micélio em cultivo submerso (Rosado *et al.*, 2003).

### **2.4.1 Fontes de carbono**

Carboidratos são considerados importantes fontes de carbono e energia para a maioria dos fungos superiores (Fang & Zongh, 2002). A presença de carboidratos no meio de cultura, torna-se um fator essencial para o crescimento do cogumelo e para a síntese de proteínas (Martin, 1986). Fang & Zongh (2002) investigaram o efeito de fontes de carbono sobre o crescimento micelial de *Ganoderma lucidum*, o acúmulo de ácido ganodérico e a produção de

polissacarídeos. A menor produção de biomassa celular foi obtida quando sacarose foi utilizada no meio de cultura. Entretanto, os melhores resultados com relação à biomassa foram obtidos em meios contendo maltose, lactose e glicose, respectivamente. Ainda, os autores avaliaram o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre o crescimento micelial, obtendo resultados entre 10,8 e 16,7g.L<sup>-1</sup> de biomassa em até dez dias de cultivo.

Hwang *et al.* (2003b), em cultivo submerso de *Phellinus gilvus*, examinaram nove fontes de carbono, adicionadas ao meio de cultura em concentração inicial de 1% (p/v). Os autores observaram que a adição de frutose, manitol, sorbitol e sacarose ao meio de cultura foram favoráveis ao crescimento micelial e à produção de polissacarídeos. Entretanto, a maior produção de biomassa (3,83g.L<sup>-1</sup>) e polissacarídeos (1,61g.L<sup>-1</sup>) foi obtida com sorbitol.

As características fisiológicas e morfológicas da cultura submersa de *P. florida* foram avaliadas por Burns *et al.* (1994). Com o objetivo de produzir exopolissacarídeos, cinco fontes de carbono foram testadas. Pequenas quantidades de biomassa foram produzidas nos meios compostos por xilose e lactose; já a galactose não suportou o crescimento do fungo. Exopolissacarídeos foram produzidos em quantidades moderadas no meio contendo sacarose, porém em menores níveis do que com glicose.

Kim *et al.* (2002a) estudaram condições ótimas para a cultura submersa de *Flammulina velutipes* visando à produção de angiotensina, uma importante substância com ação anti-hipertensiva e, portanto, auxiliar na prevenção de acidente vascular cerebral. Para isso, diferentes fontes de carbono foram estudadas em concentração de 2% (p/v). Após quinze dias de incubação, observou-se que, em geral, monossacarídeos foram melhores fontes de carbono para o crescimento micelial do que os dissacarídeos e polissacarídeos testados. As adições de glicose, frutose e manose resultaram nos máximos rendimentos miceliais (6,4, 5,9 e 6,1mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Já, a sacarose, quando presente no meio de cultura, resultou

na maior produção de angiotensina, quando comparado aos resultados obtidos nos meios contendo glicose, frutose e manose.

#### **2.4.2 Fontes de nitrogênio**

Mesmo sendo os substratos naturais muito pobres no conteúdo de nitrogênio, o corpo de frutificação é produzido. A habilidade que o gênero *Pleurotus* apresenta para colonizar substratos pobres em nitrogênio é uma adaptação ecológica para o seu crescimento e sobrevivência natural sobre madeiras (Leonowicz *et al.*, 1990). Entretanto, para cultivos comerciais objetivando bom rendimento e obtenção de corpos de frutificação com elevado conteúdo de nitrogênio, é necessário adicionar ao meio de cultivo concentrações adequadas deste nutriente para possibilitar maior produtividade, uma vez que há necessidade de nitrogênio para síntese de proteínas, ácidos nucleicos e glicosamina, principal componente da parede celular (Bano & Rajarathnam, 1988a).

Para Leonowicz *et al.* (1990), a utilização de várias fontes de nitrogênio depende de aspectos individuais do fungo, sendo que algumas espécies, como *Lentinus lepideus*, utilizam fontes de nitrogênio inorgânico, enquanto outras preferem fontes de nitrogênio orgânico. Em sua grande maioria, os cogumelos se desenvolvem melhor na presença de aminoácidos.

Comparando fontes de nitrogênio orgânico com fontes de nitrogênio inorgânico, verificou-se que as últimas permitem uma produção de biomassa micelial e de exopolissacarídeos relativamente baixa (Bano & Rajarathnam, 1988a). Lee *et al.* (2004) também observaram baixa produção de exopolissacarídeos e biomassa quando nitrogênio inorgânico foi testado em substituição ao orgânico.

Diversos estudos reportam muitos compostos nitrogenados, com diferenças na eficiência para o crescimento de várias espécies de *Pleurotus*. Certos compostos que favorecem o crescimento de uma espécie podem não favorecer outra. Este fato é atribuído às

diferenças na secreção e liberação de nitrogenases específicas que, durante a fase de crescimento, transformam e utilizam a fonte de nitrogênio no metabolismo. É importante ressaltar que a fonte de nitrogênio produz mudanças no pH do meio, influenciando no crescimento e rendimento micelial (Bano & Rajarathnam, 1988a). Segundo Kim *et al.* (2005a), a omissão de nitrogênio no meio geralmente prejudica a produção de biomassa e de metabólitos intermediários.

Burns *et al.* (1994) avaliaram as características fisiológicas e morfológicas de *P. florida* em cultura submersa para a produção de exopolissacarídeos em frascos agitados. O meio utilizado para o crescimento fúngico foi composto de glicose (20g.L<sup>-1</sup>) e de nitrogênio orgânico (asparagina e fenilalanina). Neste trabalho, a adição da fonte de nitrogênio foi reduzida para um décimo do meio original e o efeito de sua limitação sobre o crescimento micelial foi investigado. A partir disso, observou-se redução da biomassa quando comparado com o meio original, ao passo que a produção de exopolissacarídeos aumentou.

Ao estudar o efeito de quatorze compostos nitrogenados sobre a produção de biomassa e proteínas por *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. sapidus* e *P. ostreatus*, Khanna & Garcha (1985) observaram máximo rendimento micelial e máxima produção de proteínas nos meios contendo peptona e asparagina. Asparagina foi, também, a melhor fonte de nitrogênio orgânico para *P. flagellatus*, de acordo com o observado por Bano & Rajarathnam (1988a). Nitrato de potássio e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio inorgânico foram os preferidos por todas as espécies. Nitrato de amônio e cloridrato de amônio, também mostraram crescimento satisfatório de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*; no entanto, estes compostos não foram considerados eficientes para *P. flagellatus*. Jandaik & Kapoor (1976) reportaram maior crescimento de *P. sajor-caju* com nitrato de potássio.

Fang & Zhong (2002), ao comparar o efeito de fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e cloridrato de amônio) com fontes orgânicas (extrato de levedura, peptona

e caseína) sobre a produção de biomassa, elementos bioativos e polissacarídeos de *G. lucidum*, observaram maior crescimento micelial nos meios contendo nitrogênio orgânico. Elevada concentração celular ( $4,7\text{g.L}^{-1}$ ) e uma razão média de crescimento de 2,44mm por dia foram obtidos quando uma combinação de extrato de levedura e peptona de carne foram testadas. Estes resultados sugeriram aos autores que certos aminoácidos essenciais não seriam sintetizados por células de fungos superiores a partir de fontes de nitrogênio inorgânico.

Rosado *et al.* (2003), ao estudarem o cultivo submerso de *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseos*, observaram que exopolissacarídeo bruto pode ser obtido a partir de um meio de cultura de baixo custo. Os dados sugerem que elevadas concentrações de sulfato de amônio afetam negativamente a produção de exopolissacarídeos.

#### **2.4.3 Razão carbono e nitrogênio**

Entre os fatores químicos e físicos, a razão C/N é um importante parâmetro e precisa ser observado no meio de cultivo, pois afeta o crescimento micelial e a biossíntese de muitos metabólitos (Wu *et al.*, 2004). Segundo Fasidi & Olorunmaiye (1994), uma razão C/N ótima contribui para aumentar o rendimento da biomassa e, também, pode afetar a composição química do micélio, especialmente no que se refere ao conteúdo de fibra dietética e monossacarídeos. Em estudo realizado por Park *et al.* (2001), o efeito da razão C/N sobre a produção de biomassa e exobiopolímeros foi investigado utilizando sacarose e pó de água de lavagem da indústria beneficiadora de milho, sendo a elevada razão 20:1 preferida por *Cordyceps militaris*, com biomassa de  $27\text{g.L}^{-1}$  e produção de exobiopolímeros de  $7\text{g.L}^{-1}$ .

Wu *et al.* (2004) observaram para *P. tuber-regium* que razões extremas de C/N no meio de cultura resultaram em baixo rendimento micelial. A condição ótima foi obtida em razão C/N de 24:1 (30g de glicose e 4g de extrato de levedura por litro de meio). No entanto, este resultado não diferiu estatisticamente do meio com razão C/N variando entre 18:1 e 36:1,

indicando que o nível de tolerância de *P. tuber-regium* à razão C/N não foi limitado. Neste mesmo estudo, Wu *et al.* (2004), evidenciaram um aumento no conteúdo total de fibra dietética presente no micélio de *P. tuber-regium* em baixa razão C/N (6:1), sugerindo que grande quantidade de extrato de levedura no meio de cultura foi crucial para biossíntese de compostos presentes na parede celular do fungo, induzindo um elevado conteúdo de fibra dietética no micélio. A quantidade obtida no micélio crescendo em razão C/N de 6:1 foi de 71,5% do conteúdo total de fibras, duas vezes superior ao obtido com razão C/N de 96:1 (30,1%). A razão C/N do meio de cultura também afeta o conteúdo de resíduos de monossacarídeos presentes nas fibras do micélio. Desta forma, foi observada elevada proporção de manose e galactose, assim como elevado nível de glicosamina no conteúdo total de fibra quando o micélio cresceu em meio com baixa razão C/N. Os maiores componentes da fibra dietética foram polissacarídeos, incluindo  $\beta$ -glucanos, quitina e mananos. O principal monossacarídeo encontrado foi glicose, o qual indicou a presença de glucanos, seguido por glicosamina e manose, que implicaram na presença de quitina e mananos.

#### **2.4.4 Fontes de lipídio**

A fim de acelerar o crescimento micelial de algumas espécies de cogumelos, óleos vegetais vêm sendo testados na composição dos meios de cultivo, uma vez que possuem efeitos estimulatórios. Muitos trabalhos reportam a utilização de ácidos graxos, óleos vegetais e surfactantes, promovendo a produção de alguns tipos de ácidos, aflatoxinas e carotenóides, assim como enzimas e polissacarídeos extracelulares. No entanto, o efeito de lipídios e/ou ácidos graxos sobre a secreção destes metabólitos fúngicos podem ser de repressão ou de estimulação; o resultado depende do tipo de ácido graxo presente no óleo e de sua concentração no meio (Leonowicz *et al.*, 1990).

Yang *et al.* (2000) realizaram estudos sobre o efeito de óleos vegetais na produção micelial e de polissacarídeos em *G. lucidum* em cultura submersa. Os resultados revelaram que todos os óleos adicionados ao meio foram benéficos para o crescimento celular, resultando no aumento da concentração de biomassa. Quando ácido palmítico foi adicionado ao meio, observou-se um aumento simultâneo na concentração de biomassa e de polissacarídeos. Comparativamente ao controle, a fase *lag* diminuiu de quatro para dois dias, a concentração de biomassa aumentou de 0,24 para 0,42g.100mL<sup>-1</sup> em oito dias de cultivo e houve um aumento na concentração de polissacarídeos, em níveis superiores a 40%.

Quando Yang *et al.* (2000), no mesmo estudo, avaliaram os efeitos de vários tipos e concentrações de ácidos graxos sobre o crescimento micelial e produção de polissacarídeos em cultura submersa imobilizada de *G. lucidum*, em sete dias, observaram que ácido palmítico (saturado), ácido oléico (insaturado) e ácido esteárico (saturado) apresentaram efeito estimulatório. Entretanto, ácido oléico foi o mais importante, uma vez que aumentou significativamente a concentração micelial de 0,20 para 0,46g.100mL<sup>-1</sup>. A adição de elevados níveis de ácido linoléico (poli-insaturado) suprimiu drasticamente o crescimento micelial e a produção de biomassa não foi observada. Este dado sugeriu aos autores uma correlação entre a estimulação de crescimento e a extensão da insaturação do ácido graxo. Para verificar o efeito de ácido graxo com cadeia curta, ácido linoléico (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) foi substituído pelo ácido cáprico e o resultado sobre a produção de biomassa foi inibitório. O maior efeito estimulatório foi encontrado com óleo de oliva e este resultado pode ser atribuído ao fato de seu principal componente ser o ácido oléico (18:1  $\Delta^9$ ). Já, quando ácidos graxos foram testados de forma individual, com relação à produção de polissacarídeos, verificou-se que os ácidos palmítico e oléico causam efeito positivo na formação de polissacarídeos.

Kurtzman (1976) estudou, para o crescimento de *P. sapidus*, meio líquido concentrado de soja solúvel, meio de melaço e meio de suco de alfafa. Os resultados mostraram que o

meio de melação proporcionou maior crescimento, quando comparado com os demais. No entanto, quando óleo de milho na concentração de 1% (v/v) foi adicionado aos meios, resultou em grande aumento no crescimento de *P. sapidus* no meio formulado com soja solúvel.

Kurtzman (1978) realizou estudos detalhados com relação à adição de lipídios em cultura submersa de cogumelos do gênero *Pleurotus*. O crescimento do micélio de *P. sapidus* e *P. ostreatus* foi aumentado com a adição de óleo vegetal ao meio. Baixos níveis de óleos estimularam o crescimento de *P. sapidus* e aumentaram o peso seco do micélio.

Nwanze *et al.* (2005) avaliaram os efeitos do tipo de óleo sobre o peso úmido e o peso seco do micélio de *Lentinus squarrosulus* e *Psathyrella atroumbonata* em cultura líquida. O tipo de óleo produziu efeito significativo sobre a umidade e o peso seco do micélio de *L. squarrosulus*, assim como sobre o peso úmido do micélio de *P. atroumbonata*. Entretanto, o tipo de óleo não influenciou significativamente sobre a média do peso seco do micélio de *P. atroumbonata*. Por sua vez, gordura de leite bovino influenciou na produção do micélio úmido e no peso seco de *L. squarrosulus*, quando comparado com o meio composto de óleo de coco, óleo de algodão, óleo de amendoim, óleo de palma e de semente de noz, todos testados individualmente e nas mesmas concentrações.

#### **2.4.5 Minerais e vitaminas**

Em fermentações utilizando fungos, a adição de íons minerais é reconhecida como favorável ao crescimento micelial e à produção de metabólitos secundários, como os polissacarídeos (Joo *et al.*, 2004). Em estudos realizados por Hwang *et al.* (2003a), em cultivo submerso de *P. linteus*, o bioelemento mais efetivo na produção de biomassa e exopolissacarídeos foi  $\text{CaCl}_2$ , dentre seis diferentes íons minerais testados, em concentração de 5mM. Este nutriente, quando utilizado na concentração de 7mM, foi também evidenciado

por Kim *et al.* (2005b) como íon favorável ao crescimento micelial e à produção de exopolissacarídeos em cultura submersa de *Agrocybe cylindracea*.

Xu & Yun (2003) avaliaram a influência de vários minerais sobre o crescimento micelial e a produção de exobiopolímeros de *A. polytricha*. Dentre as fontes examinadas,  $K_2HPO_4$  rendeu elevada produção de biomassa ( $6,98g.L^{-1}$ ) e exobiopolímeros ( $1,43g.L^{-1}$ ), sendo reconhecido como um bioelemento favorável ao crescimento micelial.

Park *et al.* (2001) examinaram o efeito da concentração de quatro íons minerais sobre o crescimento micelial e a produção de exopolissacarídeos em cultura submersa de *Cordyceps militaris*. Para isso, variaram-se as concentrações de  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4.7H_2O$  e  $FeSO_4.7H_2O$ . Os resultados indicaram que as concentrações ótimas destes elementos para a produção de exopolissacarídeos e o crescimento micelial foram 0,05%; 0,05%; 0,05% e 0,01% (p/v), respectivamente.

Segundo Leonowicz *et al.* (1990), os componentes minerais do meio, como fósforo, enxofre, magnésio e potássio, influenciam não somente a produção de biomassa fúngica como também, a qualidade do aroma. Observa-se que o ideal para a produção de biomassa usualmente não condiz com o que é necessário para produção de um aroma agradável. Um exemplo é o cultivo de *A. campestris*, durante o qual houve melhor crescimento em meio com  $50mg.L^{-1}$  de fósforo. A produção de aroma, no entanto, requer uma concentração mais alta deste mineral, com valores variando entre 300 e  $400mg.L^{-1}$ . Ainda, Leonowicz *et al.* (1990) ao utilizarem outros minerais no meio de cultivo do mesmo fungo, observaram que o melhor aroma foi obtido com potássio em concentração de 100 e  $300mg.L^{-1}$ ; no entanto, a maior quantidade de biomassa foi obtida com magnésio em concentrações de  $20mg.L^{-1}$ .

Vitaminas, como cofatores de muitos sistemas enzimáticos, são indispensáveis para o crescimento de cogumelos. Foi observado que não houve crescimento micelial de *P. flabellatus* em meio sintético na ausência de vitaminas como niacina, riboflavina, ácido

pantotênico, ácido p-aminobenzóico, cianocobalamina, biotina, piridoxina e ácido fólico (Bano & Rajarathnam, 1988a).

Chahal (1989) relata que o micélio de certos cogumelos não pode crescer em meio sintético sem suplementação de vitaminas. Em seus estudos, *P. sajor-caju* apresentou baixa produção de biomassa em meio isento de suplementação.

Lee *et al.* (2004) observaram que a adição de extrato de levedura ao meio de cultura submersa, além de ser excelente fonte de nitrogênio orgânico, também serve como fonte de vitaminas ao crescimento micelial do fungo *G. frondosa*.

## **2.5 Influência de temperatura, pH, frequências de agitação e aeração e modelo de biorreator sobre o cultivo submerso de micélio fúngico**

A literatura relata inúmeros trabalhos, que descrevem as influências das condições ambientais, como temperatura, pH, aeração, frequência de agitação e modelo de biorreator sobre o crescimento micelial e produção de metabólitos secundários durante o cultivo submerso de fungos superiores (Yang & Liao, 1998; Kim *et al.*, 2003; Joo *et al.*, 2004).

A cultura submersa de fungos comestíveis é caracterizada pelo aumento na viscosidade do caldo em função do tempo, em consequência de fatores como a crescente concentração celular, mudanças na morfologia microbiana ou acúmulo de substâncias extracelulares que alteram as características do meio. Após estas mudanças, problemas devem ser considerados e resolvidos, especialmente o suprimento de oxigênio, uma vez que afeta o crescimento celular, a morfologia, os nutrientes e a biossíntese de metabólitos (Zhong & Tang, 2002).

Rau *et al.* (1992) reportaram, para o cultivo de fungos filamentosos, que o suprimento suficiente de oxigênio resultou em aumento na taxa de crescimento específico e em

decréscimo na taxa de produção de glucanos extracelulares. Resultados contrários são apresentados por Yang & Liao (1998), no que se refere à produção exopolissacarídeos. Estes autores investigaram a resposta de *G. lucidum* para níveis intermediários de dissolução de oxigênio em cultura submersa em frascos agitados. Os resultados mostram que uma elevada razão de transferência de oxigênio favoreceu a formação de exopolissacarídeos.

Fungos superiores usualmente requerem um pH com valores entre 4 e 7,5. Valores de pH ótimos para o cultivo de *A. campestris* em cultivo submerso estão entre 5,1 e 7,5; para *Boletus edulis* entre 4,5 e 5,5 e para *Polyporus anceps* entre 4 e 7. Os fungos que decompõem madeiras, como *Trametes versicolor*, *Pholiota mutabilis*, *P. ostreatus*, *Phlebia radiata* de *Phanerochaete chrysosporium*, preferem um pH mais baixo, variando entre 3,5 e 5,5 (Leonowicz *et al.*, 1990).

Para investigar os efeitos do pH inicial e da temperatura sobre o crescimento micelial e a produção de exopolissacarídeos, *Sarcodon aspratus* foi cultivado em frascos agitados sob diferentes valores de pH e temperatura. O máximo crescimento micelial (10,2g.L<sup>-1</sup>) e produção de exopolissacarídeos (0,51g.L<sup>-1</sup>), foram obtidos com valores de pH inicial de 5 e temperatura de 25°C (Joo *et al.*, 2004).

Xu & Yun (2003) estudaram *A. polytricha* sob variados valores de pH e temperatura. Elevados valores de biomassa foram alcançados em pH 8 e temperatura de 25°C, entretanto máxima produção de exopolissacarídeos foi obtida com valor de pH 5.

Yang & Liao (1998) apresentaram os resultados de uma série de experimentos realizados em frascos agitados durante sete e quatorze dias de cultivo submerso de *G. lucidum*. Observaram que, com pH inicial de 3, a razão de produção de polissacarídeos foi muito baixa, resultando em uma concentração de 0,65mg.mL<sup>-1</sup> em quatorze dias. No entanto, quando o valor do pH foi aumentado para 4, elevada concentração de exopolissacarídeos

(1,52mg.mL<sup>-1</sup>) foi obtida. Já os valores de temperatura considerados ótimos para a produção de exopolissacarídeos por este fungo foram observados entre 30 e 35°C.

A temperatura, por interferir diretamente no metabolismo, exerce grande influência no crescimento dos fungos. Em cultivos sólidos de cogumelos *Pleurotus* spp., Zadrazil (1978) constatou que a velocidade de crescimento micelial de *P. ostreatus*, *P. florida* e *P. eryngii* foi linear em temperaturas menores que 15°C. Em temperaturas entre 15 e 20°C ocorreu aceleração na velocidade de crescimento e entre 20 a 30°C houve redução.

Zadrazil (1978) constatou que a temperatura ótima de crescimento micelial de *P. eryngii* foi de 25°C (cerca de 6mm/dia). Para *P. ostreatus* e *P. florida*, a temperatura ideal foi de 30°C e a velocidade de crescimento foi de aproximadamente 14mm/dia. A 35°C, todas as linhagens testadas apresentaram redução na velocidade de crescimento.

Aumento da velocidade de crescimento micelial de *P. ostreatus* em temperaturas entre 20 e 30°C também foi observado por Furlan *et al.* (1997), sendo que estes autores constataram que a maior velocidade foi alcançada a 30°C. Para *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, Zervakis *et al.* (2001), constataram comportamento similar aos relatados por Furlan *et al.* (1997).

Lee *et al.* (2004), em um estudo objetivando a produção de biomassa e de exopolissacarídeos em cultivo submerso de *G. frondosa*, em temperaturas variando entre 20 e 30°C observaram que um ótimo de 25°C. Martin (1983) observou temperatura ótima de 25°C para o crescimento de *Morchela esculenta* em meio líquido.

Os efeitos da razão de aeração e frequência de agitação sobre a produção de exopolissacarídeos são fatores importantes que afetam sucessivamente o progresso da fermentação. A agitação é também um importante parâmetro para adequar a mistura entre a transferência de massa e de calor. A agitação causa mudanças na morfologia celular, variação no crescimento micelial e formação de produtos (Park *et al.*, 2002).

Um estudo desenvolvido por Kim *et al.* (2003) foi realizado com o intuito de investigar os efeitos da razão de aeração e frequência de agitação sobre a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos por *Paecilomyces sinclairii* em reator de tanque agitado de 5L. Neste trabalho, foram testadas razões de aeração de 0,5; 1,5 e 3,5vvm. Os dados mostraram que elevada produção de biomassa micelial (44,9g.L<sup>-1</sup>) e de exopolissacarídeos (10,89g.L<sup>-1</sup>) foram obtidos com elevada razão de aeração (3,5vvm).

O tempo necessário para formação de exopolissacarídeos em cultura submersa de *G. lucidum* foi estudado por Yang & Liao (1998), através da variação da razão de aeração entre 1 e 1,5vvm. Elevada razão de aeração favoreceu a rápida formação de exopolissacarídeos em estágio precoce e a máxima concentração foi obtida após cinco dias de cultivo.

Próprio da complexa morfologia do fungo em cultura submersa, as condições de agitação requerem grande atenção. Em produções industriais envolvendo cultura submersa, a morfologia micelial varia entre a formação de grumos e formas filamentosas, dependendo das respectivas condições de cultura e genótipo das linhagens (Márquez-Rocha *et al.*, 1999).

Márquez-Rocha *et al.* (1999) reportaram a influência da agitação, aeração e geometria das pás sobre o crescimento micelial de *P. ostreatus* em biorreator. Rápido crescimento micelial e forma morfológica similar aos grumos formados em frascos agitados foram encontrados em biorreator sob condição de fluxo de ar entre 0,5 e 1vvm. Estas razões produziram diferenças nos tamanhos dos aglomerados fúngicos formados (3,7 e 3,5mm de diâmetro, respectivamente). No entanto, um significativo decréscimo no tamanho destes (3mm de diâmetro) e na máxima velocidade específica de crescimento (de 0,036 para 0,025h<sup>-1</sup>), foi encontrado em razão de aeração de 1,5vvm. O diâmetro dos aglomerados fúngicos foi reduzido em 60% com um aumento na frequência de agitação para 400rpm, o que também resultou no decréscimo da velocidade específica de crescimento, provavelmente ocasionada pela elevada força de corte, suficiente para desmanchar os aglomerados fúngicos. Assim, a

aeração e a frequência de agitação são parâmetros que podem afetar negativamente, resultando na diminuição da razão de crescimento micelial e tamanho dos aglomerados. Isto pode ser devido à impossibilidade de agregar a hifa após o rompimento de um aglomerado, visto que é necessário que estes sejam rompidos para promover o crescimento, produzindo novos aglomerados a partir de mais velhos. A influência das pás sobre o crescimento da hifa promove o balanço entre a fragmentação e o crescimento (Márquez-Rocha *et al.*, 1999).

Embora existam poucos estudos sobre biorreatores apropriados para o crescimento de basidiomicetes, a estrutura do equipamento pode ser importante na medida em que, provavelmente, interfere na morfologia e na quantidade de biomassa formada. O mecanismo de agitação pode determinar o crescimento micelial, sugerindo que reatores *airlift* possam ser designados como bons modelos para o crescimento de biomassa fúngica (Martin, 1986).

## **2.6 Polissacarídeos**

O interesse em polissacarídeos produzidos por microrganismos tem aumentado, especialmente os provenientes de cogumelos, devido às suas aplicações industriais, uma vez que apresentam atividades biológicas e farmacológicas (Cohen, *et al.*, 2002). A fim de obter polissacarídeos derivados de cogumelos, muitos investigadores têm se esforçado para cultivar fungos comestíveis com propriedades medicinais, primeiramente em meio sólido, para obter corpos de frutificação e, após, em meio submerso, para obtenção de micélio para extração de exopolissacarídeos (Hwang *et al.*, 2003a). Segundo Bae *et al.* (2001), pelo fato do cultivo submerso de cogumelos permitir elevada produção micelial, facilitar o controle de temperatura e permitir a manutenção da cultura asséptica, pode facilitar também a produção de exopolissacarídeos.

Os polissacarídeos são constituídos de resíduos de monossacarídeos interligados por ligações glicosídicas. Estas ligações são formadas pela eliminação de moléculas de água entre o grupo hidroxila do hemiacetal de um resíduo e um grupo hidroxil primário ou secundário do resíduo adjacente (Sutherland, 1985).

Os polissacarídeos encontrados em cogumelos são representados principalmente pelos glucanos, com diferentes tipos de ligações glicosídicas, semelhantes a (1→3), (1→6)-β-glucanos e (1→3)-α-glucanos (Wasser, 2002).

### **2.6.1 Efeitos de polissacarídeos produzidos por cogumelos**

Dentre os diferentes microrganismos, os fungos são produtores de β-glucanos, uma vez que, na parede celular da hifa e na matriz extracelular, existem mais de 75% de polissacarídeos. Uma porção de exopolissacarídeos constitui um revestimento extracelular em torno do micélio. Usualmente, esta matriz é parcialmente dissolvida no meio de cultura quando o fungo cresce em meio líquido (Gutierrez *et al.*, 1996).

Algumas espécies de *Pleurotus*, além de polissacarídeos, dispõem de efeitos fisiológicos que contribuem para enriquecerem suas pesquisas. Vários experimentos com cogumelos mostram efeitos antitumorais e antioxidantes (Wang *et al.*, 2005), assim como a influência positiva de β-glucanos sobre os efeitos terapêuticos de doenças cardiovasculares, redução do colesterol sanguíneo, ação anti-hipertensiva, aumento do sistema imune, ação antitrombótica, diminuição nas taxas de açúcar do sangue, doenças digestivas e doenças respiratórias (Wasser & Weis, 1999; Flieger *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Segundo Rosado *et al.* (2003), pesquisas apontam *Pleurotus* spp. como um cogumelo com elevada quantidade de polissacarídeos hidrossolúveis.

Muitas civilizações, especialmente a oriental, reconhecem que extratos de certos cogumelos, possivelmente devido aos polissacarídeos, podem proporcionar benefícios na

promoção da saúde e, conseqüentemente, são um componente essencial na tradicional medicina chinesa (Smith *et al.*, 2002). Os polissacarídeos podem ser usados como suplementos dietéticos ou como fortificantes para promover longevidade e aumento da qualidade de vida (Lee *et al.*, 2004).

Há muitos anos os basidiomicetes são usados clinicamente em países como o Japão, China e Coréia. A maioria das pesquisas sobre os efeitos antitumorais foi conduzida no Japão, onde foi estudado o potencial anticarcinogênico de diferentes cogumelos, inclusive espécies de *Pleurotus*. Estes polissacarídeos com ação antioxidante podem aumentar a qualidade de vida e a média de sobrevivência de pacientes que apresentam determinados tipos de câncer. O valor medicinal dos cogumelos faz com que eles sejam rotineiramente incorporados a fortificantes, chás, sopas e fórmulas constituídas de ervas terapêuticas (Smith *et al.*, 2002).

Wasser (2002) referiu ser notavelmente elevada a atividade antitumoral presente em frações de cogumelos. A análise de polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação de *P. pulmonarius* e *P. sajor-caju*, revelou diferentes níveis de atividades antitumorais, as quais foram provenientes de dezessete frações de polissacarídeos, resultantes de 21 extrações.

Com relação aos efeitos terapêuticos de cogumelos, observa-se que os mesmos não afetam diretamente as células cancerígenas, mas possivelmente os efeitos antitumorais sejam devidos à ativação de diferentes respostas imunes do hospedeiro. Estes imunomoduladores trabalham principalmente aumentando a atividade de macrófagos que atuam como um escudo protetor do corpo, protegendo-o contra resfriados, gripes, infecções e células tumorais (Wasser & Weis, 1999).

Kim *et al.* (2001) estudaram o efeito hipoglicêmico de polissacarídeos extracelulares de *P. linteus*. Neste estudo, foi possível observar que exopolissacarídeos, quando administrados em doses de 100mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, reduziu em 49% o nível de glicose sanguínea em cobaias diabéticas. O efeito de exopolissacarídeos sobre a diminuição da

glicemia pode ser explicado pelo fato destes produzirem um aumento na utilização da glicose por animais diabéticos, uma vez que promove a secreção da insulina.

Os efeitos hipocolesterolêmicos de cogumelos foram estudados por Koh *et al.* (2003), com micélio de *Cordyceps sinensis*. Os dados mostraram que a dose de 300mg/kg de peso dos ratos alimentados com dieta rica em colesterol teve um significativo efeito sobre a diminuição dos níveis séricos de colesterol total. Além disso, houve decréscimo nos riscos aterogênicos de lipídios por mudanças nos valores de colesterol HDL e VLDL+LDL.

### **2.6.2 Produção de polissacarídeos de micélio fúngico**

A produção de exopolissacarídeos por cogumelos do gênero *Pleurotus* tem sido descrita em diferentes condições de cultivo (Gutiérrez *et al.*, 1996). Rosado *et al.* (2003) avaliaram a produção de exopolissacarídeos em cultivo submerso de *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus*, em meio composto por glicose, extrato de levedura, peptona, e sais minerais, observando que elevado nível de exopolissacarídeos foi obtido com *P. ostreatoroseus* (5,8g de peso seco. L<sup>-1</sup>), após sete dias de incubação. Ao analisar a composição de carboidratos presentes nestes exopolissacarídeos, foram observadas predominâncias de glicose (95,5%), arabinose (3,2%) e xilose (1,3%), com traços de galactose e manose.

O cultivo submerso de *P. citrinopileatus* visando à produção de polissacarídeos hidrossolúveis foi estudado por Wang *et al.* (2005). Neste trabalho, verificou-se que, durante o processo de crescimento fúngico, houve uma correlação positiva entre o aumento do peso do micélio e o rendimento de hidropolissacarídeos. Quando investigadas as ótimas condições de cultivo para *P. citrinopileatus*, visando à produção de polissacarídeos solúveis em água, identificaram-se as seguintes: tempo de incubação, 21 dias; pH, 5,5; temperatura, 25°C; fonte de carbono, glicose; fonte de nitrogênio, peptona; razão C:N, 40:1. Estas condições permitiram uma produção máxima de polissacarídeos hidrossolúveis de 0,56mg.mL<sup>-1</sup>.

Kim *et al.* (2002c) utilizaram processos submersos como alternativa para a produção de exopolissacarídeos de cogumelos. Estes autores verificaram que, dentre dezenove linhagens de fungos examinadas, a maioria basidiomicetes, houve maior secreção de polissacarídeos no caldo de cultura de *G. lucidum* e *P. linteus*. Em outro estudo, Kim *et al.* (2001), ao estudarem a produção de exopolissacarídeos em cultivo submerso de *P. linteus*, obtiveram máximo resultado (3,5g.L<sup>-1</sup>) após 21 dias.

Maziero *et al.* (1999) realizaram *screening* de 56 espécies de basidiomicetes para a produção de exopolissacarídeos e biomassa em cultivo submerso. Os resultados apontaram que todas as espécies estudadas produziram exopolissacarídeos em diferentes quantidades. A melhor produção foi obtida com *Agaricus* spp., após sete dias de incubação. Somente 30%, dentre as linhagens estudadas, produziram maiores quantidades de exopolissacarídeos aos sete dias de cultivo. No entanto, 70% produziram quantidades maiores após quatorze dias.

A otimização das condições de cultura submersa para produção de exopolissacarídeos e de biomassa micelial de *G. frondosa* foram estudadas por Lee *et al.* (2004). O resultado obtido no cultivo realizado em biorreator com tanque agitado em condições ótimas para produção de exopolissacarídeos foi de 5,26g.L<sup>-1</sup>. Já, Kim *et al.* (2005b), com o fungo *Agrocybe cylindracea*, também estudou condições ótimas de cultivo para produção de exopolissacarídeos. Os resultados apontaram para uma produção máxima de 3g.L<sup>-1</sup>, alcançada após dez dias de incubação em biorreator com tanque agitado.

Como verificado no presente capítulo, muitos estudos já foram realizados enfocando a produção de biomassa e de polissacarídeos por diferentes fungos. Entretanto, para *P. sajor-caju*, são escassos os conhecimentos existentes sobre a produção de biomassa e de exopolissacarídeos em cultivo líquido, atividades desenvolvidas neste trabalho.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Linhagem

Foi utilizada a linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju*, doada pela empresa BRASMICEL – Biotecnologia em Fungicultura, localizada em Poá/SP. Esta linhagem também é empregada na produção comercial de cogumelos comestíveis e pertence à coleção de fungos do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

A linhagem foi repicada trimestralmente. Um disco de 4mm de meio colonizado com *P. sajor-caju* PS-2001 foi transferido para placas de Petri contendo o meio de manutenção, composto de: serragem de *Pinus* spp. (20g); farelo de trigo moído e intumescido em água destilada (20g); carbonato de cálcio (2g); agar-agar (20g) e água destilada q.s.p. 1L. As placas foram mantidas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante sete dias, até completo crescimento fúngico e, posteriormente, foram armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  para serem utilizadas como inóculos.

### 3.2 Meios de cultivo

#### 3.2.1 Solução mineral

A solução mineral (SM) de nutrientes e micronutrientes concentrada dez vezes (10x) utilizada nos meios de cultivo foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957), contendo:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20g);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (14g);  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (3g);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3g);  $\text{CaCl}_2$  (3g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (50mg);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (15,6mg);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (14mg);  $\text{CoCl}_2$  (20mg); água destilada q.s.p. 1L.

### **3.2.2 Meio utilizado para inóculo e controle de contaminação**

O meio utilizado para inóculo continha: glicose (5g), proteína de soja (1g), solução mineral (100mL) e água destilada (q.s.p. 1L).

O meio utilizado para realizar o controle de contaminação das amostras foi composto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$  (14g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3g),  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (3g),  $\text{CaCl}_2$  (3g), solução de mineral (10mL) e água destilada (q.s.p. 1L).

O controle de contaminação foi realizado em placas de Petri, sendo adicionada uma amostra do caldo de crescimento fúngico. A placa foi mantida em estufa a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , por até sete dias. No caso de crescimento de outro microrganismo que não o fungo de estudo, o experimento foi desprezado. Esse controle foi aplicado em todos os ensaios.

### **3.2.3 Meios de cultivo utilizados nos ensaios em agitador de bancada**

#### **3.2.3.1 Meios de cultivo contendo glicose, frutose ou sacarose como fontes de carbono**

O meio de cultivo utilizado para avaliar a fonte de carbono adequada para o crescimento micelial de *P. sajor-caju* foi o seguinte: proteína de soja (1g), extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> (1g), solução mineral (100mL) e água destilada (q.s.p. 1L). Glicose, frutose e sacarose foram testadas em concentração inicial de  $5\text{g.L}^{-1}$  na presença e na ausência de óleo de soja ( $1\text{mL.L}^{-1}$ ).

#### **3.2.3.2 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de glicose**

Foram avaliadas diferentes concentrações de glicose (5; 7,5; 10; 12,5 e  $15\text{g.L}^{-1}$ ). O meio de cultivo continha: óleo de soja (1mL), proteína de soja (1g), extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> (1g), solução mineral (100mL) e água destilada (q.s.p. 1L). As amostras foram retiradas após 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas de cultivo.

### **3.2.3.3 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de óleo de soja e de solução mineral**

A fim de estudar a influência de diferentes concentrações de óleo de soja e de solução mineral sobre o crescimento micelial de *P. sajor-caju* em cultura submersa, cinco formulações foram testadas. Os tratamentos foram elaborados variando as concentrações de óleo de soja em  $1\text{mL.L}^{-1}$  (-1) e  $2\text{mL.L}^{-1}$  (+1) e a solução mineral em  $100\text{mL.L}^{-1}$  (-1) e  $200\text{mL.L}^{-1}$  (+1). O meio de cultivo continha: glicose (10g), proteína de soja (1g), extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> (1g) e água destilada (q.s.p. 1L).

### **3.2.3.4 Meios de cultivo contendo diferentes concentrações de proteína de soja e de extrato de levedura Prodex<sup>®</sup>**

A fim de estudar a influência de diferentes concentrações de proteína de soja e do extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> sobre o crescimento micelial de *P. sajor-caju* em cultura submersa, quatro tratamentos foram testados. Os tratamentos foram elaborados variando as concentrações de extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> e de proteína de soja em valores de  $1\text{g.L}^{-1}$  (-1) e  $2\text{g.L}^{-1}$  (+1) respectivamente. O meio de cultivo continha: glicose (10g), óleo de soja (1mL), solução mineral (100mL) e água destilada (q.s.p. 1L).

## **3.3 Otimização das concentrações de proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio em frascos agitados**

O procedimento experimental padrão, baseado no método de resposta de superfície de Box & Wilson (1951), foi utilizado para otimizar o meio de cultivo submerso em relação às adições de proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio, consideradas importantes componentes do meio de cultivo. Os três parâmetros, com um número de combinações de  $2^3 =$

8 tratamentos (sendo cada um em triplicata), foram usados no plano fatorial do experimento. O plano fatorial básico do experimento, indicando os níveis de variação a serem aplicados às variáveis previamente selecionadas, é exemplificado na Tabela 1.

**Tabela 1. Plano fatorial básico do experimento.**

Parâmetros	Níveis de variação (g.L <sup>-1</sup> )			Unidades de variação (g.L <sup>-1</sup> )
	Superior (+1)	Médio	Inferior (-1)	
Variáveis analisadas	Superior (+1)	Médio	Inferior (-1)	
A*	2,0	1,5	1,0	0,5
B*	2,0	1,5	1,0	0,5
C*	2,4	1,8	1,2	0,6

Variáveis\*: (A\*) proteína de soja; (B\*) extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> e (C\*) sulfato de amônio.

Os parâmetros de maior ou menor influência sobre o desenvolvimento de biomassa micelial, foram determinados seguindo orientações estabelecidas pelo método de Box & Wilson (1951). Para isso, foi necessário estabelecer, para cada nutriente estudado, os coeficientes das variáveis. A Tabela 2 apresenta como o coeficiente da variável de cada componente foi obtido. Para obter este valor, é necessário que a soma algébrica dos rendimentos obtidos com os valores +1 e -1 seja dividida por oito, que corresponde ao número de tratamentos realizados na fase inicial do estudo.

**Tabela 2. Cálculo dos coeficientes para variáveis (CV) A\*, B\* e C\*.**

Variáveis*	A*		B*		C*	
	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)
Valores de biomassa dos tratamentos (+1 e -1)	VB	VB	VB	VB	VB	VB
	VB	VB	VB	VB	VB	VB
	VB	VB	VB	VB	VB	VB
	VB	VB	VB	VB	VB	VB
	Soma (+1)	Soma (-1)	Soma (+1)	Soma (-1)	Soma (+1)	Soma (-1)
P*	[soma (+1) – soma (-1)]		[soma (+1) – soma (-1)]		[soma (+1) – soma (-1)]	
CV	A* [soma(+1)–soma(-1)/8]		B* [soma(+1)–soma(-1)/8]		C* [soma(+1)–soma(-1)/8]	

Variáveis\*: (A\*) proteína de soja; (B\*) extrato de levedura; (C\*) sulfato de amônio. VB: igual ao resultado da produção de biomassa dos tratamentos compostos de valores em g.L<sup>-1</sup> correspondentes ao níveis +1 e -1 das variáveis A\*, B\* e C\*. P\* : produto da soma dos valores de biomassa correspondentes aos tratamentos compostos pelas variáveis (g.L<sup>-1</sup>) em níveis de +1 biomassa; subtraído pela soma dos valores de biomassa correspondentes aos tratamentos compostos pelas variáveis (g.L<sup>-1</sup>) em níveis de -1 biomassa. CV: coeficiente das variáveis A\*, B\* e C\*.

Os valores obtidos para os coeficientes das variáveis A\*, B\* e C\* indicam se o componente adicionado age favoravelmente (valores +) ou negativamente (valores -). Por sua vez, os valores absolutos para os coeficientes das variáveis A\*, B\* e C\* indicam o grau de influência (maior ou menor) do nutriente adicionado.

Para estimar as novas concentrações utilizadas, foi necessário determinar o produto entre as unidades de variação, escolhidas no início dos experimentos, cujos valores estão representados na Tabela 1, e o valor dos coeficientes das variáveis, obtidos a partir dos cálculos feitos conforme indicação da Tabela 2. Deste modo, a Tabela 3, representa o cálculo dos coeficientes das variáveis, multiplicado pelas unidades de variação.

**Tabela 3. Coeficiente das variáveis X unidade de variação.**

<b>Parâmetro</b>	<b>A*</b>	<b>B*</b>	<b>C*</b>
Coeficiente das variáveis	A*	B*	C*
Unidades de variação	0,5	0,5	0,6
Coeficiente das variáveis x unidade de variação	A*.0,5	B*.0,5	C*.0,6

O cálculo da nova variação dos parâmetros servirá para a otimização do cultivo e deve ser feito em relação ao parâmetro mais importante, ou seja, aquele que apresentou o coeficiente da variável com valor mais alto, levando em consideração os resultados obtidos na etapa inicial de estudo (cultivos iniciais). Admitindo-se que o parâmetro A tenha mostrado a maior variação, e o valor de A\* tenha sido positivo, este fato indica que o valor inicialmente escolhido pode ser aumentado. Deste modo, deve-se aumentar o valor inicialmente atribuído para o parâmetro (nutriente) A em cada tratamento. Esta análise é feita seguindo orientação do método de Box & Wilson (1951), segundo o qual, quando um determinado parâmetro apresentar maior variação, é a partir dele que deverão ser determinados os valores para os outros parâmetros (nutrientes). No caso exemplificado, como o parâmetro A apresentou a maior variação (positiva) ele será

aumentado, o índice pelo qual ele irá variar determinará a variação dos outros parâmetros. Este índice pelo qual o parâmetro A vai ser aumentado é escolhido a partir de um valor arbitrário e passa a ser denominado X1.

Exemplificando, admitindo-se as unidades de variação ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para B\* e C\* sejam de 0,5 e 0,6, respectivamente, e atribuindo-se um valor arbitrário para X1, o valor de X2 e X3 poderá ser determinado a partir do cálculo:

X2 que será igual:

$$A^* \cdot 0,5 / B^* \cdot 0,5 = \text{Valor arbitrário X1} / X2$$

$$X2 = \frac{\text{Valor arbitrário X1}}{A^* \cdot 0,5 / B^* \cdot 0,5}$$

O valor do componente C será acrescido ou diminuído de X3 que será igual:

$$A^* \cdot 0,5 / C^* \cdot 0,6 = \text{Valor arbitrário X1} / X3$$

$$X3 = \frac{\text{Valor arbitrário X1}}{A^* \cdot 0,5 / C^* \cdot 0,6}$$

Os valores obtidos para X1, X2 e X3 indicam a ordem de grandeza pelas quais os valores de cada componente devem ser adicionados ou diminuídos. A nova série dos meios experimentais, para que seja obtida a otimização das quantidades das variáveis empregadas, foi feita de acordo com a seqüência indicada na Tabela 4.

**Tabela 4. Nova série dos meios experimentais para otimização.**

<b>Parâmetros</b>	<b>A*</b>	<b>B*</b>	<b>C*</b>	<b>Rendimentos</b>
<b>Meio Basal</b>	1,5	1,5	1,8	g de biomassa.L <sup>-1</sup> cultivo
<b>Valores de modificação</b>	X1	X2	X3	
	<b>Novos Meios</b>			
<b>Controle</b>	1	2	3	Vb
<b>1</b>	1±[(1x X <sub>1</sub> )]	1±[(1x X <sub>2</sub> )]	1±[(1x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>2</b>	1±[(2x X <sub>1</sub> )]	1±[(2x X <sub>2</sub> )]	1±[(2x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>3</b>	1±[(3x X <sub>1</sub> )]	1±[(3x X <sub>2</sub> )]	1±[(3x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>4</b>	1±[(4x X <sub>1</sub> )]	1±[(4x X <sub>2</sub> )]	1±[(4x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>5</b>	1±[(5x X <sub>1</sub> )]	1±[(5x X <sub>2</sub> )]	1±[(5x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>6</b>	1±[(6x X <sub>1</sub> )]	1±[(6x X <sub>2</sub> )]	1±[(6x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>7</b>	1±[(7x X <sub>1</sub> )]	1±[(7x X <sub>2</sub> )]	1±[(7x X <sub>3</sub> )]	Vb
<b>8</b>	1±[(8x X <sub>1</sub> )]	1±[(8x X <sub>2</sub> )]	1±[(8x X <sub>3</sub> )]	Vb

Vb.: Valores de biomassa (g.L<sup>-1</sup>). Meio basal: nível médio dos parâmetros A\*, B\* e C\* que correspondem a proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio, respectivamente. Controle: meio formulado com os valores médios correspondendo aos parâmetros A\*, B\* e C\* correspondentes à proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio, respectivamente. X1, X2 e X3 correspondem aos valores de modificação que vão ser acrescidos ou diminuídos ao nível médio dos parâmetros A\*, B\* e C\*.

### 3.4 Condições de cultivo para o crescimento do micélio em frascos agitados

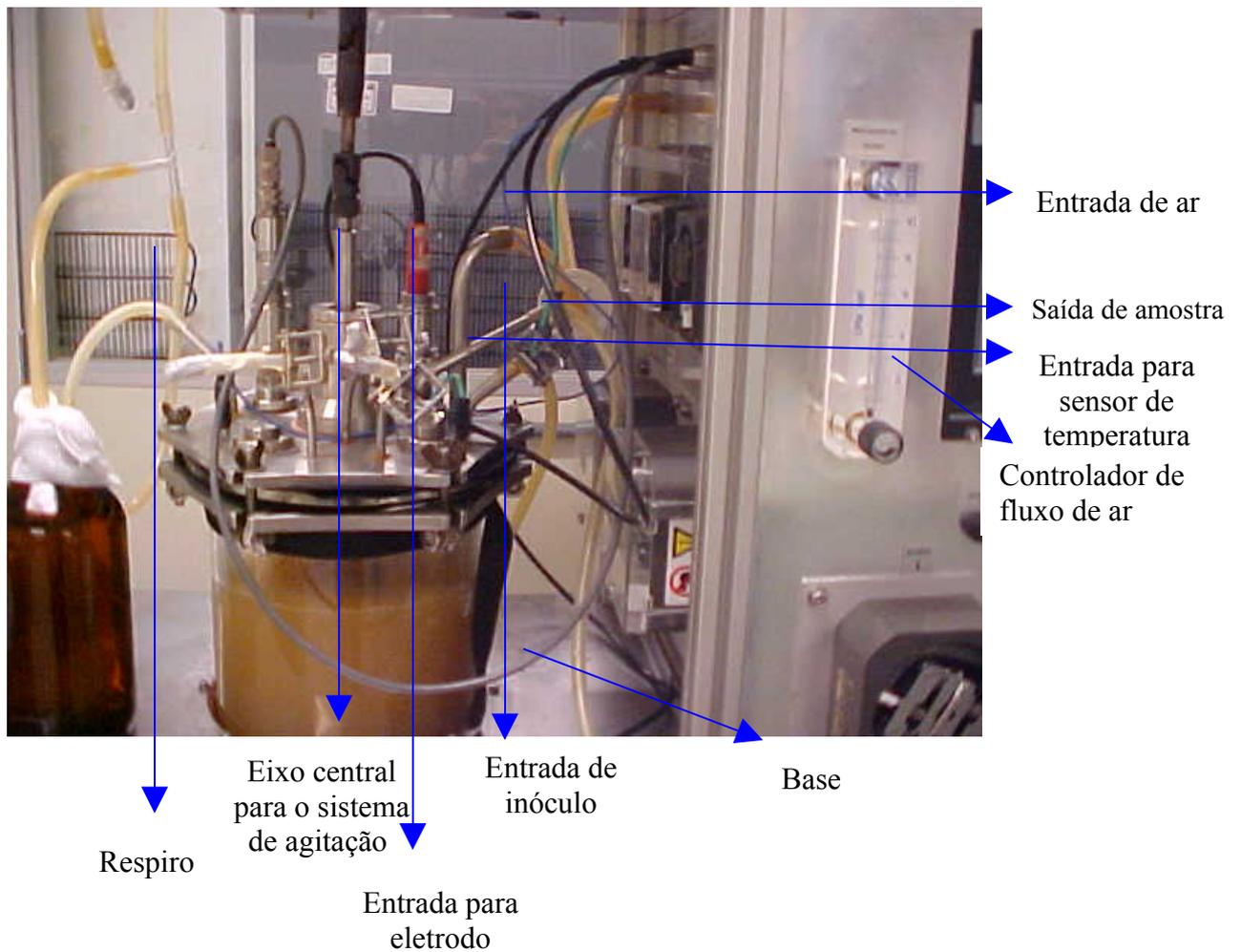
Cinco esferas de plástico com 8mm de diâmetro foram colocadas nos frascos com o intuito de evitar a formação de aglomerados de micélio (*pellets*). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio. Os frascos foram vedados com uma camada de cerca de 1cm de algodão entre duas camadas de gaze. Todos os frascos foram pesados antes e após a autoclavagem para o cálculo de perda por evaporação e o volume foi repostado com água destilada estéril. O inóculo consistiu de 5% (v/v). Os cultivos foram mantidos sob agitação recíproca de 180rpm a 28±2°C. Não foi realizado ajuste do pH.

### 3.5 Condições de cultivo para o crescimento do micélio em biorreator

Para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 em meio previamente otimizado quanto às concentrações de nutrientes (proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio), utilizou-se um biorreator de bancada de 5 litros, construído em projeto financiado pelo PADCT, com parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e o SENAI / Mecatrônica.

O biorreator (Figura 2) constitui-se de:

1. tanque com capacidade de 5L e volume operante de 4L. Este tanque é de vidro, possui forma cilíndrica, com 18cm de altura e 20cm de diâmetro;
2. sistema de agitação com oito pás associadas a um eixo central, ambos de aço inoxidável;
3. sensores para determinação do percentual de O<sub>2</sub> dissolvido, temperatura, pH e potencial redox do caldo de cultivo;
4. mecanismo para variar a frequência de agitação (rpm) em dois sentidos;
5. mangueira para a retirada de amostra, acoplada a uma bomba peristáltica;
6. entradas ligadas a mangueiras, acopladas a três bombas peristálticas para a adição de inóculo, água, bases, ácidos e anti-espumante;
7. cilindro circular perfurado, localizado na base do tanque, para a entrada de ar.



**Figura 2. Biorreator utilizado no cultivo de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.**  
(Laboratório de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia-UCS).

Para um volume de operação de 4 litros, utilizaram-se 5% de inóculo, obtido por crescimento em frascos Erlenmeyer de 500mL. As condições estabelecidas para o cultivo submerso do fungo, foram: temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , frequência inicial do agitador de 100rpm e taxa inicial de aeração de 0,5vvm, intensificadas de acordo com o aumento da viscosidade no caldo de cultivo, resultante do crescimento da biomassa.

O pH não foi controlado; no entanto, ele foi medido diariamente. O  $\text{O}_2$  dissolvido no caldo de cultivo foi mantido em valores acima de 30% da saturação.

A cada 24h de fermentação, foram retirados 50mL de amostra do caldo de cultivo (em duplicata) para dosagem da biomassa e do consumo de substrato. Os exopolissacarídeos foram dosados ao final do cultivo.

Para o cultivo de *P. sajor-caju* no biorreator, estudaram-se formulações líquidas contendo glicose ou sacarose, em concentração de  $10\text{g.L}^{-1}$ , como principais fontes de carbono.

### **3.6 Procedimentos analíticos**

#### **3.6.1 Determinação de pH e açúcares redutores totais**

O pH de cada amostra foi determinado em pH-metro digital da marca Orion, modelo 920A.

Para análise de açúcares redutores totais, alíquotas de 5mL do caldo de cultura foram centrifugadas a 5000g por 30min. A concentração de glicose foi estimada com a utilização do reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Para o preparo do reagente DNS, foram dissolvidos 2,12g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma®), 3,92g de hidróxido de sódio, 1,52g de fenol e 1,66g de metabissulfito de sódio em  $283,3\text{mL}^{-1}$  em água a  $50^{\circ}\text{C}$ . Após dez minutos, foram adicionados 61,2g de tartarato de sódio e potássio. A solução permaneceu sob leve agitação magnética durante cerca de uma hora.

Volumes de 1mL foram misturados a 3 mL da solução de DNS e mantidos por 5min. em banho-maria; após resfriamento natural, a absorbância da solução colorida foi medida em espectrofotômetro, a 545nm. A concentração de açúcares redutores totais foi estimada correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão de soluções de glicose ou sacarose hidrolisada com concentrações de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 e  $2\text{mg.mL}^{-1}$ .

Para análise da sacarose, invertase foi produzida com células de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de fermento de pão. O meio de cultivo foi constituído por: sacarose

(50g), extrato de levedura (1g), peptona (1g) e água destilada (q.s.p. 1L), adicionados em Erlenmeyer de 500mL. Como inóculo para cada frasco foi utilizado fermento de pão (1g). Os frascos foram incubados sob agitação de 180rpm a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e a suspensão centrifugada para liberação das células. Adicionou-se à solução livre de células, álcool 96° em um volume de 2:1, sendo armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$  em *overnight*. Após, a suspensão foi centrifugada a 6000rpm por 30min. a  $4^{\circ}\text{C}$ ; o precipitado foi ressuspenso em 30mL de tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,8, correspondendo à solução de invertase, estocada a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para realizar a hidrólise de sacarose, em cada tubo de ensaio foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de amostra, retirada dos cultivos, 800 $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio pH 4,8 e 100 $\mu\text{L}$  da solução de invertase. Os tubos foram deixados em banho-maria por 2 horas a  $50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, adicionou-se 1mL da solução de reagente DNS e os tubos foram colocados em água fervente por cinco minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 10mL de água destilada. O açúcar redutor foi medido de acordo com o método de Miller (1959).

### **3.6.2 Quantificação do micélio**

A biomassa micelial foi estimada após a filtração do volume total dos frascos em tecido de microfibras com poros variáveis ( $>50\mu\text{M}$ ). A lavagem dos sólidos foi realizada com 500mL de água destilada. Os filtros com as hifas foram mantidos por 24 horas a  $80^{\circ}\text{C}$  e pesados. O peso seco do micélio foi determinado a partir da diferença entre o peso do tecido e o peso total dos sólidos com o filtro.

### **3.6.3 Análise da composição centesimal do micélio**

Os teores de carboidratos, fibra alimentar, gorduras totais, gorduras saturadas e gorduras *trans*, proteína, umidade, cinzas, sódio, pH, acidez e valor calórico foram avaliados,

de acordo com as metodologias oficiais da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), resolução RDC 360 (2003).

#### **3.6.4 Quantificação de exopolissacarídeos**

A dosagem de exopolissacarídeos (EPS) foi realizada segundo Kim *et al.* (2002b). As amostras coletadas foram centrifugadas a 10000g por 20min. e, ao sobrenadante, foi adicionado o volume de quatro vezes de etanol absoluto. Em seguida, estas soluções foram homogeneizadas e mantidas por 18h a 4°C. O precipitado foi centrifugado a 10000g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco em temperatura ambiente (28±2°C) até peso constante e, então, pesado em balança analítica.

#### **3.6.5 Preparação do extrato etanólico bruto do micélio**

A preparação do extrato bruto do micélio foi realizada da seguinte forma: para cada 3g de micélio seco, triturado em moinho de facas, foram adicionados 30mL de etanol absoluto. A mistura foi mantida em bquer de 50mL, que posteriormente foi vedado com papel filme e envolvido totalmente com papel alumínio, para ficar ao abrigo da luz. A mistura permaneceu sobre agitação lenta por 24h em temperatura ambiente. Ao final de 24h, o caldo foi filtrado em papel *Whatman* n° 1 e o volume foi completado com etanol até formar 30mL, finalizando em uma solução de 10%. Para o teste de DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), foram utilizadas as concentrações de 10%, 1% e 0,01%.

#### **3.6.6 Preparação do extrato bruto dos exopolissacarídeos**

Pesaram-se 250mg de EPS e adicionaram-se até 5mL de DMSO (dimetil sulfóxido). A mistura foi colocada em banho-maria a 60°C por 2 horas. Filtrou-se e completou-se o volume para 5mL. A partir dessa solução (5%) foram preparadas as diluições de 0,5 e 0,05%. A

preparação do extrato bruto foi realizada para posterior análise da capacidade antioxidante dos exopolissacarídeos.

### **3.6.7 Avaliação da capacidade antioxidante de extratos do micélio**

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada pela medida da capacidade de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>). Para tanto, 200µL das amostras do extrato do micélio seco empregando etanol foram misturadas com 800µL de uma solução tampão Tris-HCl 100mM (Merck<sup>®</sup>), pH 7. A essa mistura foram adicionados 1000µL da solução etanólica de DPPH<sup>\*</sup> 250µM (Sigma<sup>®</sup>) e os tubos foram mantidos por 20 minutos ao abrigo da luz. A medida da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 517nm. Para o branco, as amostras foram substituídas por água destilada. Foram realizadas, no mínimo, três repetições e os resultados foram expressos em concentração de DPPH<sup>\*</sup> reduzida. (Brand-Williams *et al.*, 1995).

## **3.7 Cálculos dos fatores de conversão do substrato em biomassa, rendimento e produtividade**

### **3.7.1 Fator de conversão do substrato em biomassa**

Os fatores de conversão de substrato em biomassa, nos ensaios realizados em agitador de bancada e em biorreator, foram calculados pela seguinte equação:

$$Y_{X/S} = (X_f - X_i) / (S_i - S_f)$$

Onde:

$Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>)

$X_f$  = concentração final de biomassa (g.L<sup>-1</sup>)

$X_i$  = concentração inicial de biomassa (g.L<sup>-1</sup>)

$S_i$  = substrato inicial (concentração inicial de glicose -  $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_f$  = substrato final (concentração final de glicose -  $\text{g.L}^{-1}$ )

Os resultados foram expressos em grama de biomassa formada por grama de substrato consumido ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

### 3.7.2 Rendimento em biomassa

Os rendimentos de substrato em biomassa, nos ensaios realizados em agitador de bancada e em biorreator, foram calculados pela seguinte equação:

$$Y_{r/S} = (X_f - X_i) / (S_i)$$

Onde:

$Y_{r/S}$  = rendimento de substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$X_f$  = concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_i$  = concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_i$  = substrato inicial (concentração inicial do açúcar em  $\text{g.L}^{-1}$ )

Os resultados foram expressos em grama de biomassa formada por grama de substrato inicial presente no meio de cultivo ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

### 3.7.3 Produtividade

A produtividade em biomassa celular, nos ensaios realizados em agitador de bancada e em biorreator, foram calculadas pela seguinte relação:

$$P_X = (X_f - X_i) / t$$

Onde:

$P_X$  = produtividade volumétrica de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$X_f$  = concentração celular final ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_i$  = concentração celular inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )

t = tempo de fermentação (horas)

Os resultados foram expressos em grama de biomassa micelial formada por litro de meio de cultivo por hora ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

### **3.8 Análises estatísticas**

Os testes estatísticos foram realizados pela análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ( $p < 0,05$ ), com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.0. Também foi utilizado o teste T de *Student*, para análise de duas variáveis, utilizando nível de significância  $p < 0,05$ , através do programa Microcal Origin versão 6.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o crescimento de *P. sajor-caju* PS-2001, cultivado em cultura submersa, visando à produção de biomassa fúngica. São mostrados dados sobre a concentração de polissacarídeos no caldo de cultivo e de caracterização da biomassa. Durante a primeira fase deste trabalho, foram realizados ensaios variando as concentrações de óleo de soja, solução de sais, glicose, extrato de levedura, proteína de soja e sulfato de amônio. Para todos os tratamentos realizados, foram quantificados os valores de pH do meio de cultivo, o consumo de substrato em relação ao tempo e, ao final do experimento, a concentração de biomassa micelial.

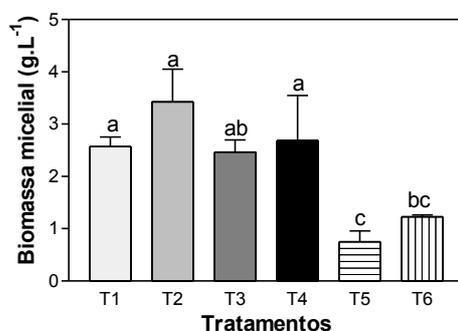
Também são apresentados os resultados de otimização do meio de cultivo em relação a alguns componentes, objetivando a máxima produção de biomassa por *P. sajor-caju* PS-2001 e os resultados de cultivo em biorreator de bancada, com relação à biomassa, sua composição nutricional e polissacarídeos.

### **4.1 Determinação da fonte de carbono para a produção de biomassa micelial de *Pleurotus sajor-caju* em cultura submersa**

Três fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) foram testadas com o objetivo de verificar sua influência sobre o crescimento micelial de *P. sajor-caju* PS-2001 em cultura submersa. Estudou-se também, como segunda fonte de carbono para o fungo, a adição de óleo de soja, com função principal de desencadear a liberação de aromas.

A Figura 3 mostra que ocorreu maior crescimento fúngico quando glicose e frutose estiveram presentes no meio de cultivo, quando comparado à sacarose. Os tratamentos compostos por glicose, sem e com óleo de soja (T1 e T2), mostraram médias superiores de

biomassa ( $2,57\text{g.L}^{-1}$  e  $3,42\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente) quando comparadas aos obtidos com frutose, embora não diferindo estatisticamente.



**Figura 3. Biomassa micelial em 96 horas de cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 com diferentes fontes de carbono, com e sem a presença de óleo de soja.** Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. T1 (Glicose  $5\text{g.L}^{-1}$  sem óleo de soja); T2 (Glicose  $5\text{g.L}^{-1}$  com óleo de soja  $1\text{mL.L}^{-1}$ ); T3 (Frutose  $5\text{g.L}^{-1}$  sem óleo de soja); T4 (Frutose  $5\text{g.L}^{-1}$  com óleo de soja  $1\text{mL.L}^{-1}$ ); T5 (Sacarose  $5\text{g.L}^{-1}$  sem óleo de soja) e T6 (Sacarose  $5\text{g.L}^{-1}$  com óleo de soja  $1\text{mL.L}^{-1}$ ).

Na Tabela 5, são mostrados dados referentes ao consumo de carboidratos. Verifica-se que, após 96 horas de cultivo, a glicose presente nos tratamentos T1 e T2 foi totalmente consumida pelo fungo, a frutose sem e com a adição de óleo de soja deixou resíduo (T3 e T4), enquanto sacarose sem óleo foi somente parcialmente consumida (T5) e com óleo (T6) não foi consumida, permanecendo 100% deste dissacarídeo no meio. Estes dados sugerem uma interferência do óleo de soja na utilização de sacarose por *P. sajor-caju*, possivelmente envolvendo o controle e a secreção de invertase pelo fungo, pois, hidrolisando a sacarose, ocorreria liberação de glicose e frutose que, como visto, são metabolizadas mesmo na presença de óleo. No tratamento T6, onde a sacarose não foi consumida, o crescimento micelial provavelmente está associado à utilização do óleo de soja como fonte de carbono.

**Tabela 5. Açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>) após 96 horas de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.**

Tratamentos	Composição do meio de cultivo	Média±DP
T1	Glicose (5g.L <sup>-1</sup> ) sem óleo de soja	0,00±0,00
T2	Glicose (5g.L <sup>-1</sup> ) com óleo de soja (1mL.L <sup>-1</sup> )	0,00±0,00
T3	Frutose (5g.L <sup>-1</sup> ) sem óleo de soja	0,15±0,27
T4	Frutose (5g.L <sup>-1</sup> ) com óleo de soja (1mL.L <sup>-1</sup> )	0,65±0,28
T5	Sacarose (5g.L <sup>-1</sup> ) sem óleo de soja	4,23±0,59
T6	Sacarose (5g.L <sup>-1</sup> ) com óleo de soja (1mL.L <sup>-1</sup> )	5,52±0,38

DP = desvio padrão. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Os dados da Figura 3 e da Tabela 5 estão de acordo com os obtidos por Joo *et al.* (2004) que, ao investigarem os efeitos de diferentes fontes de carbono em concentração de 20g.L<sup>-1</sup> sobre o crescimento micelial de *Sarcodon aspratus*, verificaram que o máximo crescimento micelial (10,62g.L<sup>-1</sup>) foi obtido com glicose; Kim *et al.* (2005b) testaram sete diferentes fontes de carbono em concentração inicial de 20g.L<sup>-1</sup> e verificaram que a máxima produção de biomassa micelial (5,5g.L<sup>-1</sup>) de *Agrocybe cylindracea* foi obtida também com glicose. A preferência evidenciada por glicose e frutose (monossacarídeos), em vez de sacarose (dissacarídeo) por *P. sajor-caju*, também é referida por Bano & Rajarathnam (1988a).

Ainda com relação à Figura 3, ao comparar os resultados de biomassa obtidos através dos tratamentos contendo glicose como a principal fonte de carbono (T1 e T2), observa-se que a adição de óleo de soja ao meio pode ter favorecido a produção de biomassa, cujas médias aumentaram de 2,57g.L<sup>-1</sup> para 3,42g.L<sup>-1</sup>, respectivamente; no entanto, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. A mesma situação, também é observada nos tratamentos com frutose, sem óleo (T3) e com óleo de soja (T4). Estes resultados podem sugerir que a adição de óleo de soja no meio de cultivo seja favorável ao crescimento de *P. sajor-caju*, inclusive utilizado, em parte, como fonte de carbono, como é o caso do tratamento T6. Dados de Kurtzman (1976) mostram aumento no crescimento de *P. sapidus* e *P. ostreatus* com a adição de 2mL.L<sup>-1</sup> de óleo vegetal no meio de cultivo. Do mesmo modo, Yang *et al.* (2000), ao realizarem experimentos para investigar a ação de ácidos graxos sobre o

crescimento micelial e produção de polissacarídeos de *Gonoderma lucidum*, verificaram que todos os óleos vegetais adicionados ao meio de cultura (10mL.L<sup>-1</sup>) favoreceram o crescimento micelial, levando ao aumento da concentração final de biomassa. Neste trabalho, observou-se que óleo de oliva foi o mais eficiente, aumentando a concentração celular de 2 para 3,3 g.L<sup>-1</sup>, enquanto a adição de óleo de soja ao meio resultou na produção de 2,3g.L<sup>-1</sup> de biomassa.

Embora os experimentos não tenham sido acompanhados de análise sensorial da biomassa micelial, verificou-se a presença de aroma típico de corpos de frutificação nos meios com a presença de óleo de soja. Gross & Asther (1989) obtiveram aumento na concentração de lactona após a adição de um triglicerídio específico para o aumento do crescimento de três diferentes fungos. Belinky *et al.* (1994) observaram alta produção de biomassa rica em aroma e sabor e geração de 1-octen-3-ol no crescimento de *P. pulmonarius* em meio líquido suplementado com semente de soja. Neste trabalho, os autores relacionaram a geração de 1-octen-3-ol com a atividade lipoxigenase durante o período de crescimento fúngico.

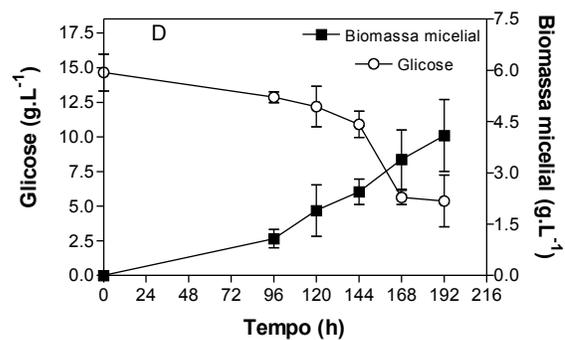
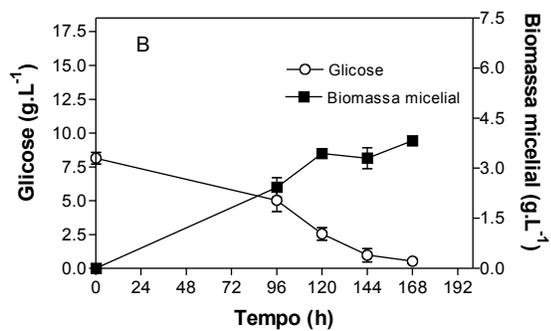
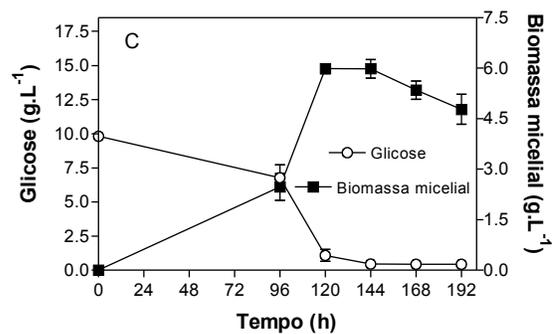
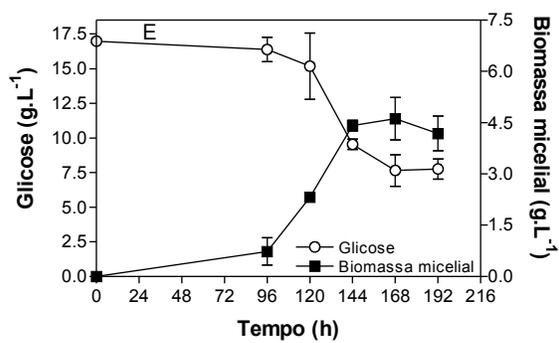
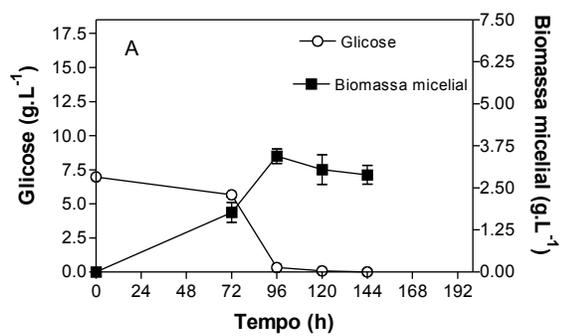
#### **4.2 Produção de biomassa fúngica com diferentes concentrações de glicose**

Avaliou-se o crescimento de *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes concentrações de glicose (5; 7,5; 10; 12,5 e 15 g.L<sup>-1</sup>), sendo os dados referentes ao crescimento micelial, ao consumo de substrato, aos fatores de conversão de substrato em biomassa, ao rendimento e à produtividade apresentados na Figura 4. Verificam-se, em todas as curvas de crescimento de biomassa nas diferentes concentrações de glicose, um comportamento crescente do micélio, seguido de um decréscimo em alguns tratamentos (Figura 4A, C e E). Esta característica do crescimento fúngico, acompanhado da queda na concentração de substrato, evidencia um consumo da glicose para a produção de biomassa, como visto nos tratamentos com

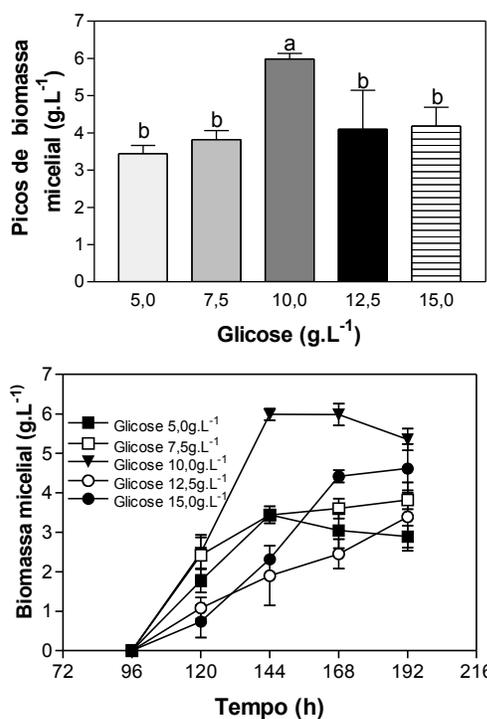
concentrações de glicose 5, 10 e 15g.L<sup>-1</sup>, acontece uma provável autólise celular, que é constatada pela queda nas curvas.

Observa-se que a maior produção de biomassa (5,98g.L<sup>-1</sup>) ocorreu no tratamento com concentração inicial de glicose de 10g.L<sup>-1</sup>, após 120h de cultivo (Figura 4C e Figura 5). Os dados com maiores concentrações de açúcar no meio de cultivo (12,5 e 15g.L<sup>-1</sup>) mostram queda nos níveis de biomassa, de 5,98 para 4,09 e 4,61g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4C, D, E e Figura 5). Adicionalmente, acredita-se que a transferência de oxigênio, que é menos eficiente quando o cultivo ocorre em frascos agitados, também possa ter influenciado.

Ao analisar o comportamento da curva de substrato em todos os experimentos (Figura 4), evidenciou-se que a glicose foi totalmente consumida, quando esteve presente em menores concentrações nos meios de cultivo (5; 7,5 e 10g.L<sup>-1</sup>), chegando ao fim após 96, 168 e 168h, respectivamente (Figura 4A, B e C). Entretanto, quando a glicose foi utilizada em concentrações maiores (12,5 e 15g.L<sup>-1</sup>), foi observado resíduo de açúcar no meio, mesmo após o término do crescimento do microrganismo (Figura 4D e E). Adicionalmente, verificou-se que após 168 e 192h de cultivo, ocorreu um decréscimo nos valores de biomassa, mesmo ainda existindo glicose no meio de cultura.

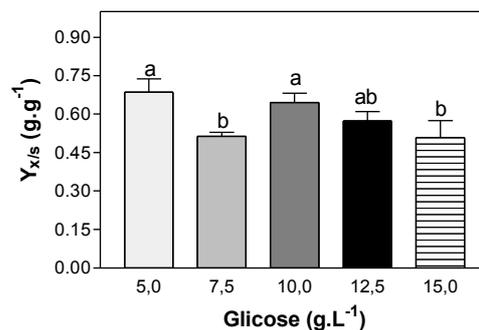


**Figura 4. Biomassa micelial e consumo de substrato durante o cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em diferentes concentrações de glicose. Os cultivos foram realizados em triplicata. A (Glicose 5g.L<sup>-1</sup>); B (Glicose 7,5g.L<sup>-1</sup>); C (Glicose 10g.L<sup>-1</sup>); D (Glicose 12,5g.L<sup>-1</sup>) e E (Glicose 15g.L<sup>-1</sup>).**



**Figura 5. Biomassa micelial de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 durante o cultivo submerso em diferentes concentrações de glicose. Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey.**

Os fatores de conversão de substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ ) são apresentados na Figura 6. Verifica-se que a média para o tratamento com  $5\text{g.L}^{-1}$  de glicose foi de  $0,68\text{g.g}^{-1}$  após 96h de cultivo, valor superior às médias obtidas para os outros tratamentos; no entanto, os valores de biomassa para o tratamento com  $5\text{g.L}^{-1}$  de glicose diferiram estatisticamente apenas dos tratamentos com  $7,5$  e  $15\text{g.L}^{-1}$ . Os valores de conversão foram superiores aos observados por Tonial *et al.* (2000) para *Volvariella volvacea*, que foram de  $0,36\text{g.g}^{-1}$  após 288h de cultivo, quando glicose foi utilizada em concentração inicial de  $16\text{g.L}^{-1}$ . Os valores mais baixos de conversão, observados por Tonial *et al.* (2000), não podem ser devidos à ausência de óleo no meio, visto que a concentração utilizada no presente trabalho foi de apenas  $0,1\%$ . Na hipótese de  $100\%$  de conversão em biomassa, situação impossível, a biomassa seria acrescida de  $1\text{g.L}^{-1}$ .



**Figura 6.** Valores máximos de conversão de substrato em biomassa micelial ( $\text{g.g}^{-1}$ ) de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey.

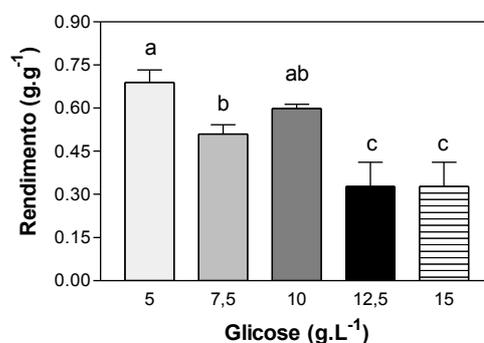
Na Tabela 6 e na Figura 7, são apresentados os rendimentos de biomassa em função do substrato inicial obtidos no cultivo submerso de *P. sajor-caju*, em diferentes concentrações de glicose ( $5$ ;  $7,5$ ;  $10$ ;  $12,5$  e  $15\text{g.L}^{-1}$ ). Como já era esperado, visto os dados de conversão, verificou-se que a média de maior rendimento ( $0,68\text{g.g}^{-1}$ ) ocorreu no tratamento com  $5\text{g.L}^{-1}$  de glicose. Entretanto, não foi observada diferença entre os tratamentos T1 e T3, com  $5$  e  $10\text{g.L}^{-1}$  de glicose, que produziram os maiores valores de biomassa (Figura 5 e 7). Quando o valor de

açúcar ( $5\text{g.L}^{-1}$ ) adicionado no meio de cultura foi triplicado ( $15\text{g.L}^{-1}$ ), constatou-se uma diminuição no rendimento. Este fato mostra que não existiu um aumento da biomassa fúngica em função do aumento do substrato inicial, indicando que não há aumento da produtividade aumentando a concentração de substrato, e sim diminuição.

**Tabela 6. Rendimento de biomassa em relação à concentração inicial de substrato ( $\text{g.g}^{-1}$ ).**

Tratamentos	Tempo de cultivo (h)		Média±DP
T1	72		0,35±0,05
	96		0,68±0,04
	120		0,60±0,08
	144		0,57±0,05
T2	96		0,32±0,06
	120		0,45±0,00
	144		0,48±0,03
	168		0,51±0,03
T3	96		0,24±0,04
	120		0,59±0,01
	144		0,59±0,02
	168		0,53±0,02
	192		0,47±0,04
T4	96		0,08±0,02
	120		0,15±0,06
	144		0,19±0,03
	168		0,27±0,06
	192		0,32±0,08
T5	96		0,08±0,02
	120		0,15±0,06
	144		0,19±0,03
	168		0,27±0,06
	192		0,32±0,08

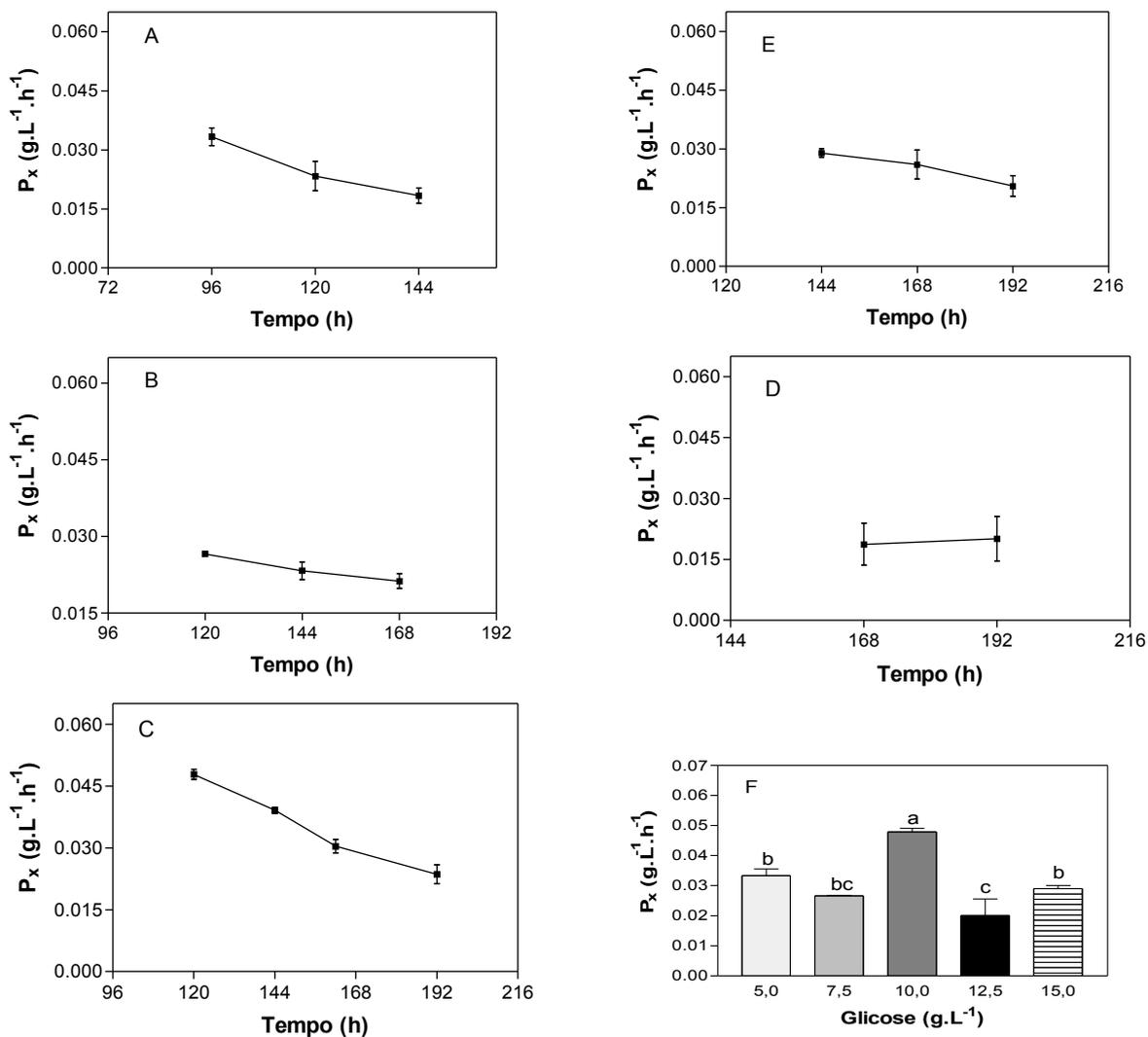
T1 (Glicose  $5\text{g.L}^{-1}$ ); T2 (Glicose  $7,5\text{g.L}^{-1}$ ); T3 (Glicose  $10\text{g.L}^{-1}$ ); T4 (Glicose  $12,5\text{g.L}^{-1}$ ) e T5 (Glicose  $15\text{g.L}^{-1}$ ).



**Figura 7. Valores máximos de rendimento de biomassa micelial em função da concentração inicial de substrato e *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.** Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey.

Estes resultados corroboram os apresentados por Guillén-Navarro *et al.* (1998), que obtiveram produção de biomassa de  $4,12\text{g.L}^{-1}$  e rendimento de  $0,61\text{g.g}^{-1}$ , quando glicose foi utilizada em concentração inicial de  $5\text{g.L}^{-1}$ , durante o cultivo submerso de *P. ostreatus*. Ainda neste estudo, foram testadas diferentes concentrações de glicose ( $0,5$ ;  $5$ ;  $10$ ;  $15$  e  $20\text{g.L}^{-1}$ ) no crescimento submerso de *P. ostreatus*; os autores observaram menor quantidade de micélio ( $1,27\text{g.L}^{-1}$ ), porém um maior rendimento de biomassa de  $1,47\text{g.g}^{-1}$  quando o açúcar foi utilizado no meio em concentração inicial de  $0,5\text{g.L}^{-1}$ . Contudo, a maior produção de biomassa foi alcançada com glicose em concentração inicial de  $20\text{g.L}^{-1}$  ( $8,6\text{g.L}^{-1}$  em 384h de cultivo), porém um menor rendimento foi evidenciado ( $0,41\text{g.g}^{-1}$ ).

A Figura 8 apresenta os valores de produtividade de biomassa, de acordo com as variações nas concentrações de glicose adicionadas nos diferentes meios de cultivo. Verifica-se que a produtividade de  $0,048\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , obtida no tratamento composto de  $10\text{g.L}^{-1}$  de glicose (Figura 8C), é maior em relação às obtidas nos outros tratamentos.

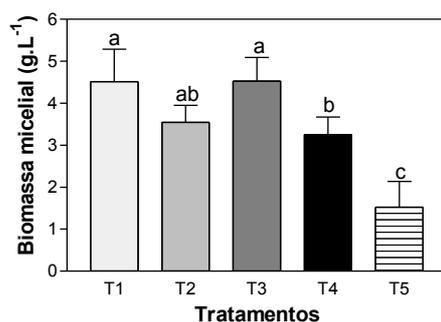


**Figura 8. Produtividade em biomassa micelial de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.** Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. A (Glicose 5  $\text{g.L}^{-1}$ ); B (Glicose 7,5  $\text{g.L}^{-1}$ ); C (Glicose 10  $\text{g.L}^{-1}$ ); D (Glicose 12,5  $\text{g.L}^{-1}$ ); E (Glicose 15  $\text{g.L}^{-1}$ ) e F (Picos de produtividade nas diferentes concentrações de glicose).

### 4.3 Influência de óleo de soja e da solução de sais na produção de biomassa micelial de *Pleurotus sajor caju* PS-2001

Após a constatação de que a adição de óleo de soja ao meio de cultura pode proporcionar uma condição favorável ao crescimento de *P. sajor-caju*, testaram-se cinco tratamentos, onde foram combinadas duas concentrações de óleo de soja e de solução mineral. Nos meios, estes componentes foram utilizados em níveis mais alto de concentração (+1) ( $2\text{mL.L}^{-1}$  e  $20\text{mL.L}^{-1}$ , respectivamente) e mais baixo (-1) ( $1\text{mL.L}^{-1}$  e  $10\text{mL.L}^{-1}$ , respectivamente).

A Figura 9 mostra que os valores de biomassa produzida nos tratamentos T2 e T3 (2 e  $1\text{mL.L}^{-1}$  de óleo de soja, respectivamente) não diferiram. Entretanto, ambos, foram superiores ao controle (sem óleo e sem meio de sais). Verificou-se que os tratamentos com o maior nível (+1) de solução mineral apresentaram as maiores médias de biomassa com relação aos de menor nível (-1). No entanto, quando somadas as biomassas produzidas com maior (+1) ou menor (-1) concentração de sais, verificou-se diferença estatística entre a soma dos dois níveis (biomassa +1 e -1 =  $9,04\text{g.L}^{-1}$  e  $7,07\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente).

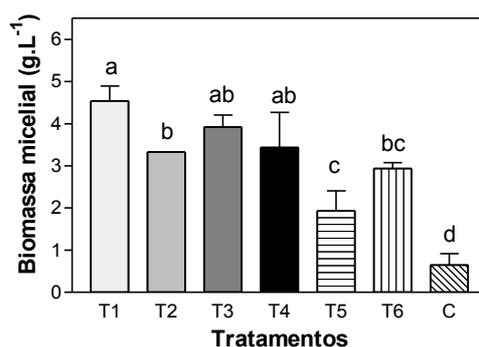


**Figura 9.** Biomassa micelial de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em cultivos submersos com variação da concentração de óleo de soja e de solução de sais. Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. T1 [+1 óleo de soja ( $2,0\text{mL.L}^{-1}$ ) e +1 solução de sais ( $20,0\text{mL.L}^{-1}$ )]; T2 [+1 óleo de soja ( $2,0\text{mL.L}^{-1}$ ) e -1 solução de sais ( $10,0\text{mL.L}^{-1}$ )]; T3 [-1 óleo de soja ( $1,0\text{mL.L}^{-1}$ ) e +1 solução de sais ( $20,0\text{mL.L}^{-1}$ )]; T4 [-1 óleo de soja ( $1,0\text{mL.L}^{-1}$ ) e -1 solução de sais ( $10,0\text{mL.L}^{-1}$ )] e T5 [controle (sem óleo de soja e sem solução de sais)].

#### **4.4 Produção de biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em cultivo submerso com diferentes concentrações de extrato de levedura Prodex® e de proteína de soja**

Buscando estudar componentes mais econômicos na formulação do meio para crescimento da linhagem PS-2001 de *P. sajor-caju*, estudou-se a fonte protéica de menor custo no mercado, que é a proteína de soja, e uma fonte de extrato de levedura (Prodex®), proveniente da borra da indústria cervejeira. Nos tratamentos, foram variadas as concentrações desses componentes em níveis mais altos (+1) e mais baixos (-1) (2g.L<sup>-1</sup> e 1g.L<sup>-1</sup>, respectivamente).

Como se observa na Figura 10, o tratamento (T1) formulado com as maiores concentrações de proteína de soja (+1) e extrato de levedura (+1), resultou na maior média de produção de biomassa fúngica. Também, ao comparar os tratamentos nos quais foram variadas as concentrações de proteína de soja e extrato de levedura em +1 e -1, pode-se observar que a fonte de nitrogênio de maior influência sobre o crescimento micelial foi a proteína de soja (T2 e T3); no entanto, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. Quando proteína de soja esteve ausente no meio de cultivo (T5 e C), resultou na menor produção de biomassa ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos valores obtidos em T1, T2, T3 e T4. O tratamento controle, formulado sem proteína de soja e sem extrato de levedura, apresentou o menor valor de produção de biomassa fúngica, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e sugerindo que a adição de nitrogênio orgânico ao meio de cultivo é favorável ao crescimento de *P. sajor-caju* PS 2001.



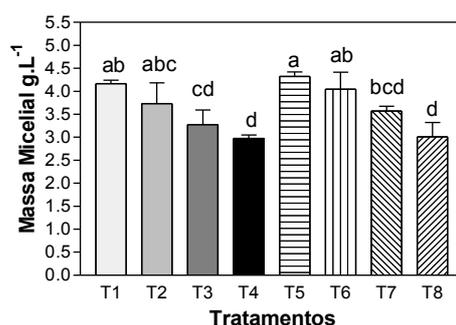
**Figura 10. Biomassa micelial durante o cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 com variação nas concentrações de extrato de levedura Prodex® e de proteína de soja.** Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas de três repetições diferiram estatisticamente. T1 [EL (+1) e PS (+1)]; T2 [EL (+1) e PS (-1)]; T3 [EL (-1) e PS (+1)]; T4 [EL (-1) e PS (-1)]; T5 [EL (-1) e PS (ausente)]; T6 [EL (ausente) e PS (-1)] e Controle [EL (ausente) e PS (ausente)].

Estes resultados corroboram os descritos por Tonial *et al.* (2000) que observaram, para os meios não suplementados com fontes de nitrogênio orgânico, uma menor produção de biomassa micelial de *V. volvacea* do que a observada nos meios suplementados com peptona, extrato de levedura e proteína de soja. Xu & Yun (2003), ao estudarem os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio, adicionados no meio de cultura em concentração de 10g.L<sup>-1</sup>, sobre o crescimento de *Auricularia polytricha*, observaram que a presença de extrato de levedura no meio resultou na maior produção de biomassa (6,1g.L<sup>-1</sup>). Em outro estudo, Lee *et al.* (2004) observaram que extrato de levedura na concentração de 6g.L<sup>-1</sup> favoreceu a maior produção de biomassa micelial (4,5g.L<sup>-1</sup>) em *G. frondosa*.

#### 4.5 Produção de biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em cultivos submersos combinando proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio

As combinações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio sobre o desenvolvimento da biomassa fúngica foram analisadas variando suas concentrações

no meio, de acordo com a metodologia proposta por Box & Wilson (1951). O objetivo deste estudo foi alcançar aumento na produção de biomassa micelial, diminuindo o tempo de cultivo. Para este fim, em uma etapa inicial, os nutrientes foram adicionados ao meio de cultura em duas concentrações diferentes, como mostrado na Tabela 1 do capítulo Materiais e Métodos. Foram realizados experimentos utilizando  $\text{KNO}_3$  como fonte de nitrogênio (dados não mostrados); no entanto, as médias de biomassa obtidas nos testes realizados com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram superiores, justificando o uso desse nutriente nos experimentos descritos. Adicionalmente, foram realizados cultivos na ausência de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (dados não mostrados); entretanto, assim como os resultados observados com  $\text{KNO}_3$ , os valores obtidos foram significativamente inferiores aos meios contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os resultados de produção de biomassa nos meios contendo diferentes concentrações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio, são apresentados na Figura 11. Uma maior média de produção de biomassa ( $4,31\text{g.L}^{-1}$ ) foi obtida no tratamento contendo  $2\text{g.L}^{-1}$  de proteína de soja,  $2\text{g.L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,2\text{g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio; no entanto, esta não diferiu de T1, T2 e T6 (biomassas de  $4,16\text{g.L}^{-1}$ ;  $3,73\text{g.L}^{-1}$  e  $4,04\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente). A partir dos dados obtidos neste experimento, foi elaborada a Tabela 7.



**Figura 11. Produção de biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 a partir da variação nas concentrações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio no meio de cultivo.** Os cultivos foram realizados em quadruplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. T1 [PS(+1), EL(+1), SA(+1)]; T2 [PS(+1), EL(-1), SA(+1)]; T3 [PS(-1), EL(+1), SA(+1)]; T4 [PS(-1), EL(-1), SA(+1)]; T5 [PS(+1), EL(+1), SA(-1)]; T6 [PS(+1), EL(-1), SA(-1)]; T7 [PS(-1), EL(+1), SA(-1)]; T8 [PS(-1), EL(-1), SA(-1)]. PS - proteína de soja (+1=2,0 e -1=1,0), EL - Extrato de levedura (+1=2,0 e -1=1,0) e SA - sulfato de amônio (+1=2,4 e -1=1,2).

Os dados apresentados na Figura 11 foram, então, utilizados para organizar a Tabela 7. Nesta tabela, as colunas nas quais os tratamentos receberam as maiores adições de nutrientes estão indicadas por (+1) e aquelas nas quais os tratamentos receberam adições menores estão indicadas por (-1). Os valores das somatórias, suas respectivas diferenças e os valores de coeficientes das variáveis também são apresentados. Desta forma, visando à otimização do meio de cultivo, os dados assim obtidos foram utilizados como indicadores para os valores dos parâmetros a serem aplicados nos novos tratamentos.

**Tabela 7. Valores médios de biomassa fúngica (g.L<sup>-1</sup>) obtidos de acordo com a variação no meio de cultura das concentrações (g.L<sup>-1</sup>) de proteína de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio.**

<b>Variáveis</b>	<b>PS (+1) 2g.L<sup>-1</sup></b>	<b>PS (-1) 1g.L<sup>-1</sup></b>	<b>EL (+1) 2g.L<sup>-1</sup></b>	<b>EL (-1) 1g.L<sup>-1</sup></b>	<b>SA (+1) 2,4g.L<sup>-1</sup></b>	<b>SA (-1) 1,2g.L<sup>-1</sup></b>
Valores de biomassa nos tratamentos (+1 e -1)	4,16 3,73 4,31 4,04	3,27 2,97 3,56 3,00	4,16 3,27 4,31 3,56	3,73 2,97 4,04 3,00	4,16 3,73 3,27 2,97	4,31 4,04 3,56 3,00
Soma	16,25	12,82	15,32	13,75	14,13	14,94
[soma (+1) – soma (-1)]	16,25-12,82		15,32-13,75		14,13-14,94	
P*	3,43		1,56		-0,800	
CV*	(+) 0,43		(+) 0,19		(-) 0,1	

Proteína de soja (PS), extrato de levedura (EL) e sulfato de amônio (SA). P\*: produto da soma dos valores de biomassa correspondentes aos tratamentos compostos pelas variáveis (g.L<sup>-1</sup>) em níveis de +1 biomassa subtraído pela soma dos valores de biomassa correspondentes aos tratamentos compostos pelas variáveis (g.L<sup>-1</sup>) em níveis de -1 biomassa. CV\*: coeficiente das variáveis = P\* / 8 tratamentos.

Foram encontrados valores positivos de CV\* para proteína de soja e extrato de levedura Prodex®; entretanto, para sulfato de amônio, foi encontrado um valor negativo (Tabela 7). Assim, para a formulação do meio de cultivo, os parâmetros extrato de levedura e proteína de soja tiveram suas concentrações aumentadas em todos os tratamentos, já a concentração de sulfato de amônio foi diminuída, a partir do valor de concentração básico.

O fato do maior valor de CV\* dentre os parâmetros analisados ter sido o da proteína de soja, indicou que este nutriente foi o que mais influenciou na produção de biomassa micelial.

A partir da determinação dos valores de coeficiente das variáveis, foram calculados os valores de variação para cada parâmetro, os quais indicaram as ordens de grandeza pelas quais foram aumentadas as quantidades de proteínas de soja e de extrato de levedura e diminuídas as quantidades de sulfato de amônio no meio de cultura.

Sendo proteína de soja o parâmetro que apresentou o maior valor de coeficiente de variável, arbitrariamente, optou-se por variá-la em múltiplos de  $0,1\text{g.L}^{-1}$ . O valor  $0,1\text{g.L}^{-1}$  corresponde ao índice X1, como descrito em Materiais e Métodos.

Multiplicaram-se os coeficientes de variáveis (CV) (Tabela 7) pelas respectivas unidades de variação (UV) (Tabela 1), encontrando-se para proteína de soja o valor de 0,21g [obtido da multiplicação do valor de 0,43g (CV) pelo valor 0,5g (UV)]; para o extrato de levedura, o valor de 0,09g [obtido da multiplicação de 0,19g (CV) pelo valor de 0,5g (UV)] e para o sulfato de amônio, o valor de -0,06g [resultado da multiplicação de -0,1g (CV) pelo valor 0,6g (UV)].

As concentrações dos parâmetros proteína de soja, representada por X1, extrato de levedura, representado por X2, e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , representado por X3, foram determinadas. Desta forma, a partir do valor de  $0,1\text{g.L}^{-1}$  para X1, foi calculado o valor de X2 da proporção de  $0,21/0,09 = 0,1/X2$ , sendo X2 igual a 0,045g. Dando seguimento, o valor de X3 foi calculado da proporção  $0,21/-0,06 = 0,1/X3$ , sendo o valor de X3 igual a -0,028g.

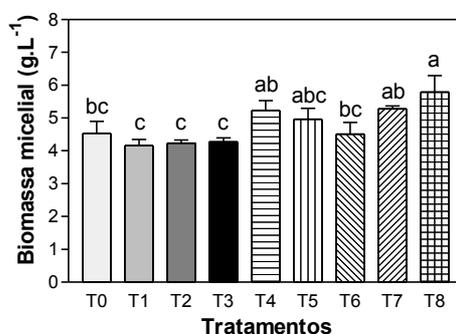
A Tabela 8 foi construída com base nos valores de X1, X2 e X3 e indica a adição, em  $\text{g.L}^{-1}$ , de proteína de soja e extrato de levedura, assim como a diminuição de sulfato de amônio nos oito diferentes tratamentos, que representaram o processo de otimização do meio de cultivo.

**Tabela 8. Formulação dos tratamentos para a otimização do cultivo.**

Parâmetros	PS (g.L <sup>-1</sup> )	EL (g.L <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )
Meio basal	1,50	1,50	1,80
Valores de modificação	0,10	0,045	-0,028
<b>Novos Tratamentos</b>			
<b>T0</b>	1,50	1,50	1,80
<b>T1</b>	1,50g+[(1).0,10g]	1,50g+[(1).0,045g]	1,80g+[(1).-0,028g]
<b>T2</b>	1,50g+[(2).0,10g]	1,50g+[(2).0,045g]	1,80g+[(2).-0,028g]
<b>T3</b>	1,50g+[(3).0,10g]	1,50g+[(3).0,045g]	1,80g+[(3).-0,028g]
<b>T4</b>	1,50g+[(4).0,10g]	1,50g+[(4).0,045g]	1,80g+[(4).-0,028g]
<b>T5</b>	1,50g+[(5).0,10g]	1,50g+[(5).0,045g]	1,80g+[(5).-0,028g]
<b>T6</b>	1,50g+[(6).0,10g]	1,50g+[(6).0,045g]	1,80g+[(6).-0,028g]
<b>T7</b>	1,50g+[(7).0,10g]	1,50g+[(7).0,045g]	1,80g+[(7).-0,028g]
<b>T8</b>	1,50g+[(8).0,10g]	1,50g+[(8).0,045g]	1,80g+[(8).-0,028g]

PS (proteína de soja); EL (extrato de levedura); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de amônio). As quantidades indicadas se referem a valores adicionados ou subtraídos em cada tratamento (frascos contendo 100mL de meio).

Na Figura 12 são apresentados os resultados da produção de biomassa micelial após quatro dias de cultivo. A maior média (5,49g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no tratamento T8, o qual diferiu de T0, T1, T2 e T3, que mostraram os menores valores.



**Figura 12. Produção de biomassa micelial da linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* nos meios otimizados.** Os cultivos foram realizados em triplicata. Barras com letras distintas indicam que as médias diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. Tratamentos são apresentados na Tabela 8.

Analisando os dados da Figura 12 pode-se observar que, na medida em que se aumentou o conteúdo de proteína de soja e de extrato de levedura no meio de cultura, houve pequenos aumentos nas médias de biomassa produzida. Ainda, se estes nutrientes tivessem seus valores de adição aumentados no meio de cultivo, talvez fosse possível obter maiores

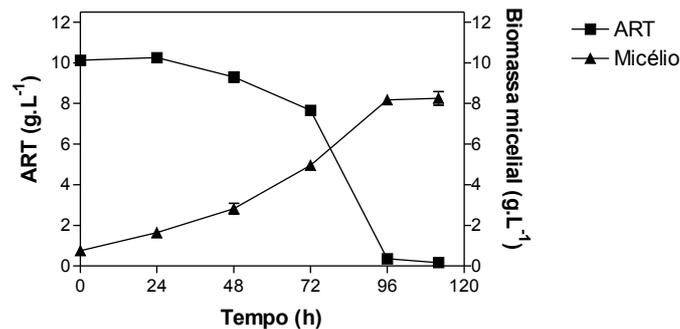
concentrações de micélio; no entanto, existe um comprometimento com a viabilidade econômica do meio, uma vez que os custos da proteína de soja e do extrato de levedura podem ser significantes quando em maiores concentrações no caldo.

#### **4.7 Produção de biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator de bancada**

Para iniciar os estudos de escalonamento para a produção de biomassa fúngica de *P. sajor-caju*, o fungo foi também cultivado em biorreator de cinco litros. Para o meio, utilizaram-se as mesmas concentrações de proteína de soja, extrato de levedura Prodex® e sulfato de amônio do tratamento T8, cujos dados foram apresentados na Figura 12. Foram conduzidos experimentos utilizando glicose e sacarose em concentrações de  $10\text{g.L}^{-1}$

A Figura 13 mostra os resultados de biomassa e de consumo do substrato, obtidos durante o cultivo submerso de *P. sajor-caju* em biorreator de bancada com  $10\text{g.L}^{-1}$  de glicose. Neste experimento, verificou-se que os valores de pH variaram de 6,5, no início do cultivo, para 5, no final, sendo indicativos da existência de metabolismo energético, que é gerador de condição ácida. Observa-se que os dados referentes à produção de biomassa apresentam um comportamento crescente, paralelamente ao decréscimo de substrato, comportamento semelhante ao evidenciado nos cultivos em frascos agitados. Quando comparados os resultados referentes à biomassa produzida durante o cultivo no biorreator e a obtida em frascos agitados com o mesmo meio (T8) [glicose ( $10\text{g.L}^{-1}$ ); óleo de soja ( $1\text{mL.L}^{-1}$ ); solução de sais ( $100\text{mL.L}^{-1}$ ); proteína de soja ( $2,3\text{g.L}^{-1}$ ); extrato de levedura ( $1,86\text{g.L}^{-1}$ ); sulfato de amônio ( $1,57\text{g.L}^{-1}$ )] (Figura 12), observa-se que os valores foram maiores no biorreator ( $8,18\text{g.L}^{-1}$ ) em relação aos frascos ( $5,49\text{g.L}^{-1}$ ). Como já era esperado, visto pelos resultados de biomassa, foram também observados, no biorreator, valores superiores de rendimento

( $0,82\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,08\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), quando comparados aos dados obtidos durante o cultivo em frascos ( $0,55\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $0,05\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente). Os melhores resultados de crescimento do fungo *P. sajor-caju* no biorreator, em comparação com os de frascos agitados, podem estar relacionados à eficiência no suprimento de oxigênio.



**Figura 13. Biomassa micelial e açúcares redutores totais durante cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator.** Meio constituído de: glicose ( $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); óleo de soja ( $1\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ); solução de sais ( $100\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ); proteína de soja ( $2,3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); extrato de levedura ( $1,86\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e sulfato de amônio ( $1,57\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Os valores de biomassa de *P. sajor-caju* obtidos no presente trabalho (Figura 13) foram mais baixos do que os obtidos por Burns *et al.* (1994) que observaram valores de  $9,7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; no entanto, os autores utilizaram um meio formulado com o dobro da concentração de glicose [20% (p/v)], na produção de biomassa de *P. florida* em biorreator de 2L.

Durante o cultivo, as condições iniciais de frequência do agitador no biorreator, com fluxo de ar constante de  $0,5\text{vvm}$ , precisaram ser aumentadas de 100rpm no início para 250rpm, para manter uma concentração de oxigênio dissolvido acima de 30% de saturação, o que aparentemente foi acompanhado por aumento na viscosidade do caldo. Dados de Kim *et al.* (2003) mostraram aumento da produção de biomassa de *Paecilomyces sinclairii* quando a frequência do agitador foi de 250rpm, mantendo o oxigênio dissolvido acima de 30%.

Xu & Yun (2003) avaliaram o crescimento de *Auricularia polytrichae* em biorreator de tanque agitado de capacidade de 5L com meio otimizado. O melhor resultado para a produção de biomassa ( $35,5\text{g.L}^{-1}$ ) foi obtido após oito dias de cultivo.

Após ter sido realizada a completa separação da biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *P. sajor-caju* do caldo, determinou-se o conteúdo de exopolissacarídeo bruto, que resultou, ao final do cultivo, em  $1,18\text{g}$  de matéria seca. $\text{L}^{-1}$ . Este valor é similar ao encontrado por Rosado *et al.* (2003) com o fungo *P. ostreatus* “florida”, que produziu  $1,4\text{g}$  de peso seco. $\text{L}^{-1}$  de exopolissacarídeos, quando cultivado em meio líquido com uma concentração mais alta de glicose ( $60\text{g.L}^{-1}$ ), após sete dias de ensaio. Entretanto, o rendimento máximo de exopolissacarídeos ( $5,8\text{g}$  de matéria seca. $\text{L}^{-1}$ ) foi encontrado para *P. ostreatoroseus*, cultivado nas mesmas condições.

Na Tabela 9, com propósito comparativo, são apresentadas as quantidades dos principais componentes encontrados em 100 gramas de micélio seco de *P. sajor-caju* PS-2001 obtidos no presente trabalho em cultivo submerso, contendo glicose, e do corpo de frutificação da mesma linhagem, obtidos por Silva *et al.* (2004). Como pode ser observado, o micélio e o corpo de frutificação continha 4,1% e 35,8% de carboidratos solúveis e 46,4% e 19,55% de fibra alimentar, sendo o somatório dos dois componentes entendidos como carboidratos totais (55,5% e 55,35%, respectivamente). Estes dados revelam semelhanças no conteúdo de carboidratos entre as duas estruturas fúngicas analisadas e podem ser comparados com a somatória dos valores de carboidratos e fibras encontrados na literatura para corpos de frutificação. Bisaria *et al.* (1987) analisaram o conteúdo de carboidratos totais presentes no corpo de frutificação de *P. sajor-caju*, cultivado em diferentes resíduos agrícolas e encontraram, para este componente, valores que variaram de 41,2% a 47,1%. Chang *et al.* (1981), ao cultivarem *P. sajor-caju* em quatro diferentes substratos, encontraram valores de carboidratos totais variando entre 39% a 50,7% em 100g de biomassa seca.

**Tabela 9. Composição química do micélio de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.**

	Micélio	Corpo de frutificação*
Fibra alimentar (%)	46,45	35,8
Carboidratos (solúveis) (%)	4,1	19,55
Proteínas (%)	32,1	36,36
Gorduras totais (%)	10,2	2,3
Gorduras saturadas (%)	3,57	n.d.
Gorduras <i>trans</i> (%)	<0,27	n.d.
Resíduo mineral fixo (%)	7,14	5,97
Sódio (mg)	387,36	n.d.
Valor calórico (kcal)	362,6	244,5

\*Corresponde ao corpo de frutificação de *P. sajor-caju* PS-2001 cultivado em serragem de eucalipto (Silva *et al.*, 2004). Ensaio físico-químico que correspondem a 100g de micélio e corpos de frutificação secos.

n.d. = não determinado.

Os conteúdos de proteínas do micélio produzido em cultivo submerso e do corpo de frutificação cultivado em serragem de eucalipto, de 32,1% e 36,36%, respectivamente, mostram semelhança. Manu-Tawiah & Martin (1987), ao analisar o valor de proteínas presentes no micélio de *P. ostreatus* obtido em cultivo submerso em meio sintético composto de 45g.L<sup>-1</sup> de glicose, 3g.L<sup>-1</sup> de citrato de amônio, soluções de sais e algumas vitaminas, observaram valores 25,7%/100g de micélio seco. Entretanto, no presente trabalho, o valor de proteínas obtido em cultivo líquido com glicose foi superior ao valor referido na literatura para cultivo sólido, uma vez que Bonatti *et al.* (2004), ao analisar a composição nutricional do corpo de frutificação de *P. sajor-caju* cultivado em palha de bananeira e em palha de arroz, observaram valores menores de proteína, correspondendo a 18,4% e 13,0%, respectivamente.

O conteúdo de gorduras totais (10,2%) presentes no micélio de *P. sajor-caju* (Tabela 9) também mostrou similaridade ao valor determinado no micélio de *P. ostreatus* cultivado em meio sintético por Manu-Tawiah & Martin (1987) em cultivo submerso. Entretanto, pode-se observar que o micélio foi mais rico em gorduras totais do que o corpo de frutificação, em comparação com valores descritos na literatura e com o corpo de frutificação da mesma linhagem, que foi 2,3%, conforme apresentado na Tabela 9. Bisaria *et al.* (1987) observaram que o conteúdo de gordura presente no corpo de frutificação de *P. sajor-caju*

cultivado em diferentes resíduos agrícolas variou de 1,55% a 1,80%. Chang *et al.* (1981) encontraram valores de gorduras variando entre 1,7% a 2%, de acordo com o tipo de substrato utilizado para o cultivo de *P. sajor-caju*. Hadar & Cohen-Arazi (1986), ao comparar os constituintes químicos do micélio de *P. ostreatus* produzido em cultura submersa contendo glicose com o corpo de frutificação produzido em resíduo de algodão, observaram conteúdos similares de ácidos graxos entre as duas estruturas fúngicas; entretanto eles diferem na composição, uma vez que foi observado, para o micélio, um maior conteúdo de ácidos graxos saturados.

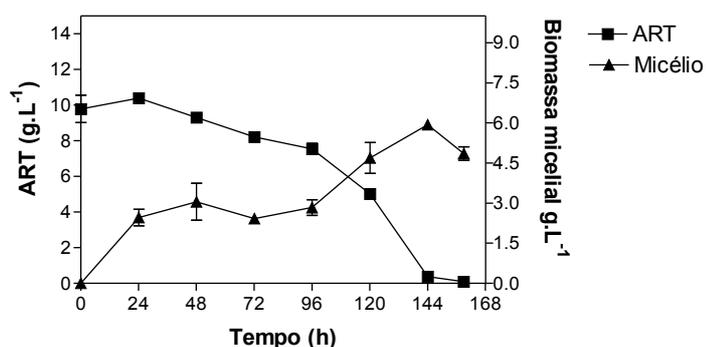
No presente trabalho, o elevado conteúdo de gorduras totais do micélio pode ter relação com a presença de óleo de soja no meio de cultivo.

Ao analisar o resíduo mineral fixo presente no micélio cultivado em meio submerso e no corpo de frutificação (7,14% e 5,97% por 100g de biomassa seca, respectivamente) (Tabela 9), observaram-se maiores valores para o micélio e similaridade nos valores do corpo de frutificação com os descritos na literatura para a mesma estrutura fúngica. Bonatti *et al.* (2004) determinaram conteúdos de resíduo mineral fixo de 5,14% e 5,59% para o corpo de frutificação de *P. sajor-caju* cultivado em palhas de bananeira e de arroz, respectivamente. O valor calórico do micélio (362,6kcal por 100g de micélio seco), também se assemelhou aos encontrados na literatura para o corpo de frutificação do mesmo fungo, os quais variaram de 198 a 300kcal por 100g de micélio seco (Chang *et al.*, 1981; Bisaria *et al.*, 1987).

Desta forma, foram encontradas semelhanças na análise química do micélio de *P. sajor-caju* PS-2001, cultivado em processo submerso com glicose como principal fonte de carbono, e do corpo de frutificação, cultivado por Silva *et al.* (2004) em serragem de eucalipto, com os valores referidos na literatura para o corpo de frutificação produzido em cultivo sólido, no que se refere às quantidades de carboidratos totais e de resíduo mineral fixo. Já os conteúdos de gorduras totais e calorias mostraram-se maiores no micélio do que no

corpo de frutificação. As diferenças encontradas com relação à composição química do micélio nos dados referidos na literatura para o corpo de frutificação do mesmo fungo, podem estar associadas a características genéticas, a diferenças nas condições de cultivo e a diferenças existentes entre as linhagens.

Na Figura 14 são apresentados os resultados obtidos no cultivo submerso de *P. sajor-caju* em meio contendo sacarose, realizado nas mesmas condições do cultivo com glicose, cujos dados foram apresentados na Figura 13. Observa-se que o fungo, quando cultivado em biorreator, foi capaz de consumir sacarose na presença de óleo de soja, diferindo do resultado encontrado em frascos agitados. Este fato pode estar associado à melhor eficiência na transferência de oxigênio no biorreator. A maior produção de biomassa foi evidenciada após 144h de cultivo; posteriormente foi observada diminuição nos valores, que pode estar relacionado ao fim do substrato no meio de cultivo, assim como ao início da fase de manutenção, seguida de uma provável autólise celular. Quando comparados os resultados dos cultivos de *P. sajor-caju* no biorreator variando as fontes de carbono (glicose e sacarose), observa-se que o maior valor de biomassa foi obtido com glicose ( $8,25\text{g.L}^{-1}$  e  $5,93\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente). Como já era esperado, mediante aos resultados de biomassa, foram também observados, para o cultivo com sacarose, valores menores de rendimento ( $0,59\text{g.g}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,04\text{g.L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), quando comparados aos obtidos com glicose ( $0,82\text{g.g}^{-1}$  e  $0,08\text{g.L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 14. Biomassa micelial e consumo de substrato durante cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator com meio otimizado. Meio constituído de: sacarose ( $10\text{g.L}^{-1}$ );**

óleo de soja ( $1\text{mL.L}^{-1}$ ); solução de sais ( $100\text{mL.L}^{-1}$ ); proteína de soja ( $2,3\text{g.L}^{-1}$ ); extrato de levedura ( $1,86\text{g.L}^{-1}$ ) e sulfato de amônio ( $1,57\text{g.L}^{-1}$ ).

A preferência por glicose em relação ao substrato parece ser característica de algumas espécies, pois resultados contrários foram encontrados por Xu & Yun (2003) que, ao avaliarem seis diferentes fontes de carbono para o crescimento de *Auricularia polytrichae* em frascos agitados, encontraram maiores resultados de biomassa micelial ( $8,26\text{g.L}^{-1}$ ) quando sacarose foi testada em concentração de  $10\text{g.L}^{-1}$ . Quando o cultivo foi realizado em biorreator de bancada de 5L com tanque agitado e volume operante de 3L, utilizando um meio otimizado composto de: sacarose 6% (p/v), extrato de levedura 2,5% (p/v) e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3% (p/v), o máximo rendimento micelial foi de  $35,3\text{g.L}^{-1}$  aos dez dias de cultivo; as condições de cultivo estabelecidas para este estudo foram temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , pH inicial de 8, frequência do agitador de 150 rpm e aeração de 2vvm.

Após a completa recuperação da biomassa no caldo de cultivo, foi determinado o conteúdo de exopolissacarídeos, que correspondeu a  $1,58\text{g}$  de matéria seca. $\text{L}^{-1}$ , após 144h. Observa-se que este resultado foi maior ( $p < 0,05$ ) ao obtido com glicose ( $1,18$  de matéria seca. $\text{L}^{-1}$ ). Desta forma, estes dados corroboram ao trabalho realizado por (Leifa *et al.*, 2006), que obtiveram máxima produção de exopolissacarídeos ( $3,47\text{mg.50mL}$ ) em 2% (p/v) de sacarose. Estes autores observaram que a sacarose se destacou quando comparada à glicose, frutose e maltose, com relação à produção de exopolissacarídeos. Também, foi observado que, em geral, dissacarídeos foram mais eficientes que monossacarídeos quando utilizados como fontes de carbono durante o cultivo líquido de *Agaricus brasiliensis* objetivando obter exopolissacarídeos (Leifa *et al.*, 2006).

As capacidades antioxidantes *in vitro* dos exopolissacarídeos e do extrato bruto do micélio foram avaliadas através da capacidade de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH\*). Observou-se, para os exopolissacarídeos, ausência de atividade antioxidante, enquanto a análise da capacidade antioxidante do extrato bruto do micélio

resultou em um nível de redução de apenas 5%. No entanto, segundo Cui *et al.* (2005), pouco se conhece sobre o efeito antioxidante de cogumelos. Sabe-se que estes organismos, usualmente, contêm uma variedade de moléculas que atuam contra os radicais livres. Este processo ocorre por meio de transferências de elétrons, de maneira semelhante a que ocorre com polissacarídeos e compostos fenólicos.

#### **4.8 Custos de produção da proteína fúngica**

O cultivo de cogumelos é uma importante prática das sociedades modernas, o que se deve ao fato de que este processo biotecnológico produz alimento de elevado valor nutricional a partir da utilização de substratos baratos (Silva *et al.*, 2002). Além disso, a proteína resultante da produção do micélio em cultivo líquido, a partir de substratos como carboidratos, pode ser de particular interesse em países em desenvolvimento, onde exista deficiência crônica deste nutriente (Manu-Tawiah & Martin, 1987).

Ao analisar a composição química de *P. pulmonarius* cultivado em meio sólido, Silva *et al.* (2002) observaram elevada porcentagem de proteína no cogumelo, indicando que ele pode ser usado como fonte protéica na nutrição de humanos.

Em outro trabalho, realizado por Chahal (1989), foi observado que o micélio de *P. sajor-caju* produzido em meio líquido composto de glicose é rico em proteínas, entretanto a análise química do conteúdo de aminoácidos revelou ser deficiente em metionina. Ao estudar a nutrição de ratos, o autor constatou que 50% do conteúdo de proteínas ofertado na dieta podem ser oferecidos através da proteína presente na biomassa do cogumelo.

A Tabela 10 apresenta o teor de proteína presente nos alimentos de origem animal, que são fontes de proteínas comumente utilizadas na dieta humana, assim como seus respectivos custos.



**Tabela 10. Composição de proteínas do corpo de frutificação X valor comercial da proteína fúngica.**

Alimento (100g)	% Proteína*	Preço do produto (R\$)**	Preço do produto (R\$ - 100g)
Gado (alcatra)	21,5	13,63 (kg)	1,36
Frango (peito)	22,0	6,29 (kg)	0,63
Leite de vaca (tipo C)	3,1	0,89 (litro)	0,09
Ovo de galinha	12,9	1,65 (dúzia)	0,16
<i>P. sajor-caju</i> (úmido)	3,21	27,00 (kg/fresco)	2,70

\*Percentual de proteínas em 100g, de acordo com a tabela de composição de alimentos (IBGE, 1996).

\*\*Preço do produto correspondente ao valor de comércio do produto de referência, coletado na rede Zaffari Vergueiro de supermercados, com sede na cidade de Passo Fundo/RS, em setembro de 2006.

Conforme a Tabela 10, pode-se observar que o teor de proteína presente em 100g de micélio úmido de *P. sajor-caju* se assemelha ao conteúdo de proteína presente em 100g de leite de vaca; no entanto, os valores são menores quando comparados às outras fontes de proteína animal apresentadas.

Levando-se em consideração que o custo do  $\text{kw.h}^{-1}$  é de R\$ 0,31 e que em uma hora um biorreator aerado de 5.000L com 3.500L de volume operante consome  $0,57 \text{ kw.h}^{-1}$ , que o rendimento e a produtividade na produção de micélio a partir de sacarose possa ser assumida tal como o obtido no presente trabalho, que foi de  $0,593 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,04 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente, e que o custo da sacarose é de R\$ 0,96/kg, pode-se estimar o custo da produção de micélio seco, como apresentado na Tabela 11. Verifica-se, entre outros dados apresentados, onde não foram computados os custos de mão de obra e de secagem que, para produzir 1 kg de micélio seco, utiliza-se 1,69 kg de sacarose a um custo de R\$ 1,63 sendo o valor de  $\text{kw.h}^{-1}$  consumido de R\$ 1,26, totalizando R\$ 2,89.

Os valores de custos de produção estimados no presente trabalho devem ser considerados apenas como indicativos, pois não foram realizados cultivos com concentrações maiores de sacarose, condição que pode aumentar a produtividade. Adicionalmente, a sacarose poderia, ainda, ser hidrolisada, para obter maiores valores de rendimento e de produtividade, tal como foi observado com glicose.

Ainda, não foram computados os valores que poderiam ser obtidos com a produção de exopolissacarídeos e de enzimas fenol-oxidases, as quais poderiam ser removidas do caldo após a separação do micélio.

**Tabela 11. Análise dos custos parciais e potencial de produção em reais de micélio de *Pleurotus sajor-caju* produzido em cultivo submerso.**

<b>Itens</b>	<b>Valores</b>	<b>Unidades</b>
Custo do kw.h <sup>-1</sup>	0,31	R\$
Consumo de kw.h <sup>-1</sup> para um biorreator de 5000L (3.500L de volume operante)	0,57	kw
Custo de 1kg de sacarose	0,96	R\$
Rendimento de micélio seco g.g <sup>-1</sup> de sacarose	0,59	g.g <sup>-1</sup>
Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,04	g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
Produção por hora (em g) de um reator de 3.500L, com produtividade 0,04 g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	140	g
Tempo de produção de 1kg de micélio seco em reator com 3500L	7,14	h
Custo dos kw consumidos para produzir 1kg de cogumelo seco	1,26	R\$
Quantidade de sacarose para produzir 1kg de cogumelo seco	1,69	kg
Custo da sacarose para produzir 1kg de micélio seco	1,63	R\$
Custo de produção de 1kg de micélio seco levando em consideração kw utilizados e a sacarose	2,89	R\$
Valor de mercado para 1kg de micélio seco de cogumelo	200	R\$
Produção por batelada do fermentador de 3500mL (144h)	20,17	kg
Valor em reais obtidos em uma batelada de 144h	4.033,61	R\$
Número de bateladas por mês admitindo 24 horas para lavagem do tanque	4	
Produção de micélio por mês admitindo quatro bateladas	80,67	kg
Custo para a produção de 80,67kg de micélio	233,08	R\$
Ganho bruto em R\$ com a produção de quatro bateladas/mês	16.134,45	R\$
Ganho líquido em R\$ com a produção de quatro bateladas mês de micélio	15.901,37	R\$

**Obs.: Nesta análise não estão computados os custos de mão de obra e de secagem do micélio.**

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise dos dados obtidos no presente trabalho, nas condições estudadas, permite concluir que:

- *P. sajor-caju* PS-2001 é capaz de crescer em meio de cultivo líquido, resultando numa biomassa com composição nutricional comparável às referidas na literatura para corpos de frutificação da mesma espécie;
- a utilização de glicose, na concentração de 10g.L<sup>-1</sup>, proporciona maior produção de biomassa micelial por *P. sajor-caju* PS-2001, comparativamente à frutose e à sacarose;
- em frascos agitados, concentrações de glicose superiores a 10g.L<sup>-1</sup> não provocam aumentos significativos na produção de biomassa fúngica;
- a adição de óleo de soja no meio de cultivo, na concentração de 1mL.L<sup>-1</sup>, favorece o aumento da biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001, além de proporcionar a formação do aroma típico de corpo de frutificação;
- proteína de soja, extrato de levedura Prodex<sup>®</sup> e sulfato de amônio, utilizados como fontes de nitrogênio, favorecem o aumento da biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 em cultivo líquido;
- o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator de mistura completa apresenta melhores condições para a produção de biomassa quando comparado aos frascos agitados;
- sacarose, quando utilizada em substituição à glicose, no meio otimizado, mostrou ser eficiente na produção de *P. sajor-caju*, quando o cultivo foi realizado em biorreator;
- a produção de exopolissacarídeos no caldo foi maior quando o cultivo foi realizado com sacarose;
- a análise dos exopolissacarídeos, assim com do extrato bruto do micélio produzido, através da extração com etanol absoluto, não revelaram atividade antioxidante.

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas sobre a produção de biomassa em cultivo líquido, sugerem-se as seguintes:

- otimizar as condições de cultivo submerso com relação aos parâmetros pH, agitação, aeração, temperatura e razão C:N para a obtenção de valores máximos de biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator de bancada;
- analisar a composição de carboidratos dos exopolissacarídeos produzidos em cultivo submerso de *P. sajor-caju* PS-2001;
- realizar estudos em biorreator de bancada utilizando regime descontínuo alimentando, visando à produção de biomassa fúngica;
- desenvolver tecnologias para agregar o micélio como aditivo protéico a alimentos industrializados, para fins de alimentação humana;
- avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico do micélio seco *in vivo* e *ex-vivo*;
- separar, purificar e caracterizar os exopolissacarídeos brutos extraídos do caldo de crescimento e os componentes com atividade antioxidante, antitrombótica, antimutagênica e antitumoral presentes no extrato etanólico do micélio seco;
- testar componentes minerais, como indutores aromáticos, para posterior emprego na indústria alimentícia;
- avaliar outras fontes de óleo vegetal como estimuladores de indução aromática e de crescimento micelial;
- estudar o efeito dos exopolissacarídeos sobre a redução de glicemia e de colesterol em animais;
- identificar o conteúdo de aminoácidos presente no micélio de *P. sajor-caju* PS-2001;
- quantificar os nucleotídeos do micélio e do corpo de frutificação;
- avaliar o custo ambiental e as externalidades referentes à produção da proteína e o custo de implantação de um sistema de produção de micélio em processo submerso.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2003). Resolução RDC 360, 23 de dezembro de 2003.
- Bae, J. T.; Park, J. P.; Song, C. H.; Yu, C. B.; Park, M. K.; Yun, J. W. (2001). Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. **J. Biosci. Bioeng.** 91: 522-524.
- Bano, Z.; Rajarathnam, S. (1987). *Pleurotus* mushrooms. Part IA. Morphology, life, cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.** 26:157-221.
- Bano, Z.; Rajarathnam, S. (1988a). *Pleurotus* mushrooms, Part IB. Pathology, in vitro and in vivo growth requirements, and world status. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.** 26: 243-311.
- Bano, Z.; Rajarathnam, S. (1988b). *Pleurotus* mushrooms, Part II. Chemical composition nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.** 27: 87-158.
- Belinky, P. A.; Masaphy, S.; Levanon, D.; Hadar, Y.; Dosoretz, C. G. (1994). Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40: 629-633.
- Bisaria, R.; Madan, M.; Bisaria, V. S. (1987). Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivate on different agro-wastes. **Biological Wastes.** 19: 239-255.
- Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chem.** 88: 425-428.
- Bononi, V. L.; Capelari, M.; Maziero, R.; Trufen, S. F. B. (1999). **Cultivo de Cogumelos Comestíveis.** 2 ed. São Paulo: Ed. Ícone.
- Box, G. E. P., Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. **J. Royal Statistical Soc.** 13: 1-45.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technol.** 28: 25-30.
- Burns, P. J.; Yeo, P.; Keshavarz, T.; Roller, S.; Evans, C. S. (1994). Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycete *Pleurotus* sp. Florida. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 566-571.
- Chahal, D. S. (1989). Production of protein-rich mycelial biomass of a mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, on corn stover. **J. Ferment. Bioeng.** 68: 334-338.
- Chang, S. T. (1999a). Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century-non-green revolution. **Int. J. Med. Mushroom.** 1: 291-300.
- Chang, S. T. (1999b). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (berk.) Sing. In China. **Int. J. Med. Mushroom.** 1: 291-300.
- Chang, S. T.; Lau, O. W.; Cho, K. Y. (1981). The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12: 58:62.
- Chang, S. T.; Miles, P. G. (1991). Recent trends in world production of cultivated mushrooms. **Mushroom J.** 505: 15-18.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582-594.
- Cui, Y.; Kim, D.-S.; Park, K.-C. (2005). Antioxidant effect of *Inotus obliquus*. **J. Ethno-Pharmacol.** 96: 79-85.
- Leifa, F.; Soccol, A. T; Pandey, A.; Soccol, C. R. (2006). Effect of nutritional and environmental conditions on production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **Food Sci. Technol. Int.** 40: 30-35.

- Fang, Q. H.; Zhong, J. J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochem. Eng. J.** 10: 61-65.
- Fasidi, I. O.; Olorunmaiye, K. S. (1994). Studies on the requirements for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian mushroom. **Food Chem.** 50: 397-401.
- Flieger, M.; Kantorová, M.; Benesová, T.; Pasoutová, S.; Votruba, J. (2003). Kinetics of soluble glucan production by *Claviceps viridis*. **Folia Microbiol.** 48: 633-638.
- Furlan, S. A.; Virmond, L. J.; Miers, D. A.; Bonatti, M.; Gern, R. M. M.; Jonas, R. (1997). Mushroom strains able to growth at high temperatures and low pH values. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 689-692.
- Gross, B.; Asther, M. (1989). Aromas from basidiomycetes: characteristics, analysis and productions. **Sci. Alim.** 9: 427-454.
- Guillén-Navarro, G. K.; Facundo J.; Márquez-Rocha; Sanchez-Vázquez, J. E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. **Rev. Iberoam. Mycologia.** 15: 302-306.
- Gutiérrez, A.; Prieto, A.; Martínez, A. T. (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Res.** 281: 143-154.
- Hadar, W.; Cohen-Arazi, E. (1986). Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1352-1354.
- Hwang, H.-J.; Kim, S.-W.; Choi, J.-W.; Yun, J.-W. (2003a). Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 309-319.
- Hwang, H. J.; Kim, S. W.; Xu, C. P.; Choi, J. W.; Yun, J. W. (2003b). Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. **J. Appl. Microbiol.** 94: 708-719.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (1996). **Tabelas de composição de alimentos - Estudo Nacional de Despesa Familiar.** 4 ed. Rio de Janeiro: IBGE. pp. 137.

- Jandaik, C. L.; Kapoor, J. N. (1976). Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth of *Pleurotus sajor-caju*. **Indian Phytopathol.** 41: 154-156.
- Joo, J. H.; Lim, J. M.; Kim, H. O.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Choi, J. W.; Yun, J. W. (2004). Optimization of submerged culture conditions for exopolysaccharide production in *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito TG-3. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 767-773.
- Khanna, P.; Garcha, H. S. (1985). Physiological studies on *Pleurotus* sp. I. Nitrogen utilization. **Mushroom News. Trop.** 5-16.
- Kim, D.-H.; Yang, B.-K.; Jeong, S.-C.; Park, J.-B.; Cho, S.-P.; Das, S.; Yun, J.-W.; Song, C.-H. (2001). Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. **Biotechnol. Lett.** 23: 513-517.
- Kim, H. H.; Na, J.-G.; Chang, Y.-K.; Lee, S. J. (2005a). Effects of dissolved oxygen control on cell growth and esopolysaccharides production in batch culture of *Agaricus blazei*. **Korean J. Chem. Eng.** 22: 80-84.
- Kim, H.O; Lim, J. M.; Joo, J. H; Kim, S. W; Hwang, H. J.; Choi, J. W.; Yun, J. W. (2005b). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresour. Technol.** 96: 1175-1182.
- Kim, J. M.; Ra, K. S.; Noh, D. O.; Suh, H. J. (2002a). Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutipes*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 29: 292-295.
- Kim, D. H.; Yang B. K.; Jeong S. C.; Park J. B.; Cho S. P.; Das S.; Yun J. W.; Song C. H. (2002b). Production of hipoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. **Biotechnol. Lett.** 23: 513-517.
- Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Park, J. P.; Cho, J. Y.; Song, C. H.; Yun, J. W. (2002c). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 56-61.
- Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Xu, C. P.; Choi, J. W.; Yun, J. W. (2003). Effect of aeration and agitation on the production of mycelia biomass and exopolysaccharides in an enthomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 321-326.

- Koh J.-H.; Kim, J.-M.; Chang, U.-J.; Suh, H.-J. (2003). Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordodyceps sinensis*. **Biol. Pharm. Bull.** 26: 84-87.
- Kurtzaman, R. H. (1978). Production of mushroom fruiting bodies on the surface of submerged cultures. **Mycologia.** 70: 179-184.
- Kurtzamn, R. H. (1976). Nutrition of *Pleurotus sapidus*: effects of lipids. **Mycologia.** 68: 286-295.
- Lee, C. B.; Bae, J. T.; Pyo, H. B; Choe, T. B; Kim, S. W.; Hwang H. J.; Yun, J. W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 369-376.
- Leonowicz, A.; Wojias-Wasilewska, M.; Rogalski, J.; Luterek J. (1990). Higher fungi as a potential feed and food source from lignocellulosic wastes. **Environ Biotechnol.** 229-253.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **Journal of Bacteriology.** 73:269-278.
- Manu-Tawiah, W.; Martin, A. M. (1987). Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. **Food Microbiol.** 4: 303-310.
- Márquez-Rocha, F. J.; Guillén, N. G. K.; Sánchez, V. J. E.; Vázquez-Duhalt, R. (1999). Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnol. Tech.** 13: 29-32.
- Martin, A. M. (1986). A review of fundamental process aspects for the production of mushroom mycelium. **J. Food Eng.** 8: 81-96.
- Martin, A. M. (1983). Submerged production of edible mushroom mycelium. **Canadian Inst. Food Sci. Technol. J.** 16:215-217.
- Maziero, R.; Cavazzoni, V.; Lúcia, V. Bononi, R. (1999). Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Rev. Microbiol.** 30: 77-84.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426 – 428.

- Nwanze, P. I.; Khan, A. U.; Ameh, J.B.; Umoh, V. J. (2005). The effect of media, oil type and rate on the mycelia wet and dry weights of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler in submerged liquid culture. **African J. Biotechnol.** 4: 326-331.
- Park, J. P.; Kim, Y. M.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Cho, Y. J.; Lee, Y. S.; Song, C. H.; Yun, J. W. (2002). Effect of agitation intensity on exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 433-438.
- Park, J.P.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Yun, J. W. (2001). Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exobiopolymer production by *Cordyceps militares*. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 76-81.
- Pettipher, G. L. (1987). Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on lignocellulosic waste. **J. Sci. Food Agriculture.** 41: 259-265.
- Putzke, J.; Putzke, M. T. L. (2002). **Os Reinos dos Fungos.** Vol. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC.
- Rau, U.; Gura, E.; Olszewski, E.; Wagner, F. (1992). Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 9: 19-26.
- Rosado, F. R.; Germano, S.; Carbonero, E. R.; Costa S. M.; Iacomini, M.; Kemmelmeier, C. (2003). Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. **J. Basic Microbiol.** 43: 230-237.
- Royse, D. J. (2002). Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 527-531.
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64: 756-762.

- Shah, Z. A.; Ashraf, M.; Ishtiaq, C. M. (2004). Comparative study on cultivation and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates (wheat straw, leaves, sawdust). **Pakistan J. Nutrition.** 3: 158-160.
- Silva, O. S.; Costa, S. M. G.; Clemente, E. (2002). Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 45: 531-535.
- Silva, C. O.; Poletto, N. P.; Cassini, C.; Munari, F. M.; Dillon, A. J. P.; Salvador, M. (2004). Capacidade antioxidante e análise nutricional de *Pleurotus sajor-caju* produzido na Região Sul do Brasil. In: XII Congresso Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, X Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, IV Encontro de Farmacêuticos do Mercosul e I Encontro Nacional de Farmacêuticos do SUS (FARMAPOLIS). **Anais.** Florianópolis, 2004.
- Slomko, E. F. (2001). Nutritional and medicinal benefits of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. submerged cultures. **Int. J. Med. Mushroom.**3: 223.
- Smith, J. E.; Rowan, N. J.; Sullivan, R. (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol. Lett.** 24: 1939-1845.
- Sturion, G. L.; Ranzani, M. R. C. (2000). Mineral composition of edible mushrooms cultivated in Brazil-*Pleurotus* spp. and others dehydrated species. **Arch. Lat. Americ. Nutricion.** 50: 102-108.
- Sutherland, L. W. (1985). Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.** 39: 243-270.
- Thomas, G. V.; Prabhu, S. R.; Reeny, M. Z.; Bopaial, B. M. (1998). Evaluation of lignocellulosic biomass from Coconut Palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Wastes J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 879-882.
- Tonial, T. M.; Soccol, C. R.; Ramos, L. P.; Chiarello, M. D. (2000). Utilization of *Volvariella volvacea* to produce biomass from potato and cassava processing residues, by submerged fermentation. **Indian J. Microbiol.** 40: 35-40.

- Wang, J.-C.; Hu, S. H.; Liang, Z.-C.; Yeh, C. J. (2005). Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus ctrinopileatus* is submerged culture and its antitumor effect. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 759-766.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60: 258 – 274.
- Wasser, S. P.; Weis, A. L. (1999). Therapeutic of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit. Rev. Immunology.** 19:65-96.
- Wood, D. (1989). International industrial biotechnology. **Mushroom Biotechnol.** 9: 5-8.
- Wu, J.-Z; Cheung, P. C. K.; Wong, K.-H; Huang, N.-L. (2004). 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 Chem.** 85: 101-105.
- Xu, C.-P.; Yun, J.-W. (2003). Optimization of submerged-culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. **Biotechnol. Appl. Biochem.**38: 193-199.
- Yang, F.-C.; Liao, C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochem.** 33: 547-553.
- Yang, F.-C; Ke, Y.-F; Kuo, S. S. (2000). Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme Microb. Technol.** 27: 295-301.
- Zadrazil, F. (1984). Upgrading lignocellulosics: production of edible fungi and animal feed. **Mushroom News. Trop.** 4: 2.
- Zadrazil, F. (1978). **Cultivation of *Pleurotus***. In: Chang, S. T.; Hayes, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, INC. pp. 521-557.
- Zervakis, G.; Balis, C. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. **Mycologia.** 100: 717-731.

- Zervakis, G.; Philipposussis, A.; Ioannidous, S.; Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature condition for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. **Folia Microbiol.** 46: 231-234
- Zhong, J.-J. G.; Tang, Y.-J. (2002). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 478-484.