

RICARDO WAGNER

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO CRESCIMENTO
DE *Ganoderma lucidum* EM CULTIVO SUBMERSO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander
Mitchell

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme
Lanzi Sasaki

CURITIBA

2003

TERMO DE APROVAÇÃO

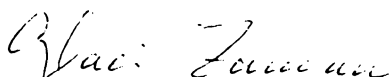
RICARDO WAGNER

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO CRESCIMENTO DE *Ganoderma lucidum* EM CULTIVO SUBMERSO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



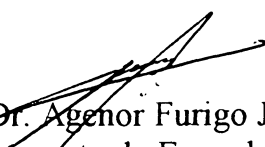
Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof.^a Dr.^a Glaci Theresinha Zancan
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof.^a Dr.^a Selma Faria Zawadzki Baggio
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Departamento de Engenharia Química, UFSC

Curitiba, 16 de setembro de 2003

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde que me permitiu realizar este trabalho.

Aos meus pais pelo apoio que sempre me deram em todas as decisões importantes que tomei em minha vida.

Aos meus tios Onélia e Glaucio por toda a ajuda e atenção dispensadas durante minha permanência em Curitiba.

Ao professor David pela excepcional orientação e incentivo, estando sempre disposto a discutir sobre andamento dos experimentos.

Ao professor Guilherme Sasaki pela co-orientação e a especial ajuda com as análises de carboidratos.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

A Angela Almeida da Embrapa Florestas por ceder a cepa de *Ganoderma lucidum* utilizada neste trabalho e pelas instruções dadas quanto ao cultivo e manutenção das culturas.

Aos amigos Rodrigo Faria e Marcelo Müller pela ajuda e pelas sugestões. Aos demais colegas do laboratório: Farah Diba, Graciele Viccini, Marcelo Barga, Alexandre Souza da Rosa e Welington Balmant pelas ajudas prestadas e pelo companheirismo.

A todo o pessoal dos laboratórios de Química de Carboidratos, deste Departamento, pelas ajudas com as análises e o cuidado com a liofilização das amostras de EPS.

Ao Laboratório de Fotomicroscopia do Setor de Ciências Biológicas pela utilização do microscópio e aos professores Yedo Alquini e Cleusa Bona do Departamento de Botânica pela disponibilização da lupa com na qual foi tirada a maioria das fotos apresentadas neste trabalho.

Ao Prof. Luiz Pereira Ramos do Departamento de Química pela atenção e tempo despendidos com as análises de CLAE.

A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.
Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURA.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CULTIVO SUBMERSO DE <i>Ganoderma lucidum</i>	3
2.1.1 Manutenção das Culturas.....	4
2.1.2 Inóculo.....	4
2.1.3 Meios de Cultura.....	6
2.2 EFEITOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO NO CRESCIMENTO E NA FORMAÇÃO DE PRODUTOS.....	7
2.2.1 Morfologia.....	7
2.2.2 Concentração Inicial de Açúcar no Meio.....	8
2.2.3 Agitação e Aeração.....	9
2.2.4 Temperatura.....	10
2.2.5 pH.....	11
2.2.6 Efeito da Densidade do Inóculo.....	12
2.2.7 Efeito de Óleos Vegetais e Ácidos Graxos.....	13
2.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE PRODUTO.....	15
2.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO.....	15
2.4.1 Cultivo em Batelada.....	16
2.4.2 Cultivo em Batelada Alimentada.....	16
2.4.3 Controle de pH em Duas Etapas.....	17
2.4.4 Cultivo em Dois Estágios.....	17
2.4.5 Cultura Imobilizada.....	18
2.4.6 Cultivo em Estado Sólido.....	19
2.5 TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO E ANÁLISE.....	20
2.5.1 Biomassa.....	20
2.5.2 Ácidos Ganodéricos.....	21
2.5.3 Polissacarídeos.....	22
2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	23
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.2.1 Estudos no Inóculo.....	32
3.2.2 Estudos no Cultivo Principal.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 ESQUEMA GERAL DE CULTIVO E DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	34
4.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA.....	35
4.3 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO I).....	35

4.4	PREPARO DO INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO II).....	35
4.5	AMOSTRAGEM.....	36
4.6	ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA EM CULTURAS NO ESTÁGIO II.....	36
4.7	ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II INICIALMENTE CULTIVADAS NA AUSÊNCIA DE GLUCOSE.....	37
4.8	CULTIVO PRINCIPAL (CULTURAS NO ESTÁGIO III).....	38
4.9	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO NA CULTIVO PRINCIPAL (ESTÁGIO III).....	38
4.10	EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NA CULTIVO PRINCIPAL (ESTÁGIO III).....	39
4.11	FRACIONAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA.....	40
4.12	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS.....	40
4.13	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE.....	41
4.14	ANÁLISE DE pH E CLAE.....	41
4.15	DETERMINAÇÃO DA GLUCOSE EM MEIO SÓLIDO.....	42
4.16	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXOPOLISSACARÍDEOS.....	43
4.17	ANÁLISE DE EPS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	43
4.18	ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO MEIO DE CULTURA.....	44
4.19	FOTOGRAFIAS.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	ESTUDOS NO INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO II).....	45
5.1.1	Observações Preliminares do Crescimento, Morfologia e Fisiologia.....	45
5.1.2	Efeitos da Alimentação de Peptona e Extrato de Levedura.....	51
5.1.3	Efeitos da Glucose na Morfologia e Fisiologia e Produção de EPS.....	55
5.1.4	Determinação da Concentração de Glucose no BDA (Culturas no estágio I).....	63
5.2	ESTUDOS NO CULTIVO PRINCIPAL (CULTURAS NO ESTÁGIO III).....	64
5.2.1	Observações Preliminares em Culturas no Estágio III.....	64
5.2.2	Efeito da Concentração do Inóculo nas Culturas no Estágio III.....	67
5.2.3	Efeito da Alimentação de Glucose nas Culturas no Estágio III.....	70
5.3	ANÁLISE PRELIMINAR DE CARBOIDRATOS.....	73
5.3.1	Análise dos Exopolissacarídeos Produzidos nos Estágios II e III.....	74
5.3.2	Análise dos Açúcares do Meio de Cultura.....	76
6	DISCUSSÃO	78
6.1	DESAGREGAÇÃO DOS <i>PELLETS</i>	80
6.2	INFLUÊNCIA DOS EPS NA DESAGREGAÇÃO DOS <i>PELLETS</i>	81
6.3	FORMAÇÃO DE PROTUBERÂNCIAS.....	83
6.4	CONSUMO DE GLUCOSE.....	84
6.5	EFEITO INDUTOR DA GLUCOSE.....	85

6.6	RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA, CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE EPS.....	88
6.7	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS.....	88
6.8	INÓCULO.....	90
6.9	CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	91
6.10	CRESCIMENTO ADERIDO À PAREDE DO FRASCO.....	92
6.11	ANÁLISES PRELIMINARES DE EPS.....	93
6.12	PONTOS QUE DEVEM SER INVESTIGADOS E PROPOSTAS DE EXPERIMENTOS.....	94
7	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
	APÊNDICE - PUBLICAÇÕES DO AUTOR RELATIVAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO.....	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTÁGIOS DO CULTIVO E DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	34
FIGURA 2 -	ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA.....	37
FIGURA 3 -	ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE EM CULTURAS CULTIVADAS INICIALMENTE SEM GLUCOSE.....	38
FIGURA 4 -	ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE EM CULTURAS NO ESTÁGIO III.....	39
FIGURA 5 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS <i>PELLETS</i> EM CULTIVO SUBMERSO NO ESTÁGIO II.....	46
FIGURA 6 -	PERFIL DAS CULTURAS NO ESTÁGIO II.....	48
FIGURA 7 -	DISTRIBUIÇÃO DA BIOMASSA EM DIFERENTES FRAÇÕES NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II.....	48
FIGURA 8 -	PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II.....	50
FIGURA 9 -	EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA EM CULTURAS NO ESTÁGIO II.....	53
FIGURA 10 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS PELA ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA NO 13º DIA DE CULTIVO.....	54
FIGURA 11 -	EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II APÓS 17 DIAS SEM GLUCOSE.....	57
FIGURA 12 -	EFEITO DA GLUCOSE NA MORFOLOGIA.....	58
FIGURA 13 -	EFEITOS DA GLUCOSE NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS AO LONGO DO TEMPO.....	61
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE DO MEIO DE CULTURA E DE UMA AMOSTRA G35-0.....	63
FIGURA 15 -	PERFIL DAS CULTURAS NO ESTÁGIO III.....	66
FIGURA 16 -	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ESTÁGIO III.....	68
FIGURA 17 -	EFEITO DO INÓCULO NAS CULTURAS DE ESTÁGIO III..	69
FIGURA 18 -	EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO III.....	72
FIGURA 19 -	EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS CULTURAS NO ESTÁGIO III...	73
FIGURA 20 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA AMOSTRA DE EPS GLII-SL.....	76
FIGURA 21 -	MODELO DESCRITIVO GERAL DOS FENÔMENOS OBSERVADOS DURANTE O CULTIVO SUBMERSO DE <i>G. lucidum</i>	79

FIGURA 22 - ESQUEMA DA PROPOSTA DE CONSUMO DE DIFERENTES SUBSTRATOS AO LONGO DO CULTIVO....	87
FIGURA 23 - ESQUEMA DE UMA PROPOSTA DE EXPERIMENTO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EPS.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM <i>Ganoderma</i> E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS.....	25
TABELA 2 -	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE EPS SUBMETIDAS A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	43
TABELA 3 -	TEMPO DE RETENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PADRÃO E DOS PICOS NOS CROMATOGRAMAS DA FIGURA 13.....	62
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE DIFERENTES AMOSTRAS DE EPS.....	74
TABELA 5 -	PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO MOSTRADO NA FIGURA 20.....	76
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES EM UMA SOLUÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácidos ganodéricos
Ara	Arabinose
BDA	Batata dextrose ágar
BM	Biomassa
CBD	Caldo batata-dextrose
CG-EM	Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d.	Dia
d.i.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetil sulfóxido
EL	Extrato de levedura
EM	Extrato de malte
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS	Exopolissacarídeo
Exper.	Experimento
Fig.	Figura
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
IE-EM	Impacto de elétrons – Espectrometria de massa
IPS	Intrapolissacarídeo
Man	Manose
P	Peptona
PB	Precipitado bastão
PC	Precipitado centrífuga
p.p.m.	Partes por milhão = δ
R_t	Tempo de retenção
r	Velocidade linear de crescimento/produção
Rha	Ramnose
TFA	Ácido trifluoracético
TOD	Tensão de oxigênio dissolvido
Tr	Traços
vvm	Volumes de ar por volume de trabalho por minuto
Xyl	Xilose

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta = p.p.m. (partes por milhão)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio diidratado
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptaidratado
HCl	Ácido clorídrico
He	Hélio
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de potássio monobásico monoidratado
$k_{\text{I,a}}$	Coefficiente de transferência de oxigênio
k_p	Parâmetro cinético que representa velocidade de crescimento
M	Massa do <i>pellet</i>
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	Dimetil sulfóxido deuterado
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de sódio heptaidratado
M_0	Massa do pellet no tempo 0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sódio monobásico monoidratado
NaHCO_3	Carbonato de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume por volume

RESUMO

O corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma lucidum* é utilizado no Oriente há mais de 2000 anos para o tratamento de diversas doenças. Há atualmente um grande interesse no desenvolvimento do cultivo submerso para a produção de micélio e produtos bioativos como polissacarídeos e terpenóides. Este trabalho aborda aspectos morfológicos e fisiológicos do fungo em culturas líquidas preparadas para serem usadas como inóculo e nas culturas principais do processo. Nas culturas do inóculo não ocorre consumo de glucose nas primeiras fases do crescimento na forma de *pellets*, entretanto este crescimento é bastante alto, pois o fungo utiliza outras fontes de carbono presentes no meio para formar biomassa. O consumo de glucose só ocorre após a desagregação dos *pellets*. O início do consumo da glucose e a desagregação dos *pellets* coincidem com o aumento da produção de exopolissacarídeos. Neste trabalho, sugere-se que as alterações morfológicas são decorrentes de alterações fisiológicas no consumo de substratos e produção de exopolissacarídeos. Durante o cultivo principal, um perfil morfológico e fisiológico semelhante ao do cultivo do inóculo é observado, entretanto os fenômenos não são tão claros devido à sobreposição de diferentes fases de desenvolvimento da biomassa inoculada. Os exopolissacarídeos produzidos tanto nas culturas do inóculo como no cultivo principal foram analisados de forma preliminar e os resultados sugerem a presença de β -glucanas. Neste trabalho, avaliou-se também o efeito da concentração do inóculo e da alimentação de quantidades extra de glucose durante o cultivo principal. A produção de exopolissacarídeos atingiu valores de $5,7 \pm 0,4$ g/L após a alimentação extra de glucose. Este valor é 3,3 maior que a máxima concentração de exopolissacarídeos reportada na literatura para esta espécie. O melhor entendimento sobre a influência de fatores morfológicos e fisiológicos na produção de polissacarídeos poderá ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de processos em larga escala.

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação trata da morfologia, fisiologia e produção de exopolissacarídeos pelo fungo *Ganoderma lucidum* na fase micelial, em cultivo submerso, durante duas etapas de um cultivo: desenvolvimento do inóculo e cultivo principal.

Ganoderma lucidum (Leyss.: Fr.) Karst é um basidiomiceto pertencente à família Polyporiaceae, também conhecido como “Ling zhi” na China e “Reishi” no Japão. Este cogumelo tem sido amplamente usado na medicina tradicional no Oriente por mais de 2000 anos. O mais antigo relato deste fungo data da época do primeiro imperador da China, Shih-huang da Dinastia Ch’in (221-227 a.C.) (STAMETS, 1993).

Ainda hoje o corpo de frutificação de *G. lucidum* é um remédio popular usado no tratamento de doenças como hepatopatia, hepatite crônica, nefrite, hipertensão, hiperlipidemia, artrite, neurastenia, insônia, asma, bronquite, úlcera gástrica, arteriosclerose, leucopenia, diabetes, anorexia (JONG; BIRMINGHAM, 1992) e câncer (STAMETS, 1993), (MIZUNO et al., 1995). *G. lucidum* produz várias substâncias com atividade biológica, como polissacarídeos e terpenóides, que podem ser responsáveis por várias destas propriedades medicinais. Frações polissacarídicas contendo (1→3)- β -D-glucanas, ramificadas principalmente na posição C-6, demonstraram alta atividade antitumoral (SONE et al., 1985). Terpenóides exibiram atividade citotóxica contra células de hepatoma (MIZUNO et al., 1995), efeito inibitório sobre a agregação plaquetária frente a diversos agonistas (SU; SHIAO; WANG, 2000) e inibição da DNA polimerase de eucarioto e da transcriptase reversa do vírus HIV tipo I (MIZUSHINA et al., 1999).

Embora as (1→3)- β -D-glucanas e diversos terpenóides denominados de ácidos ganodéricos são encontrados tanto no corpo de frutificação como no micélio cultivado em meio submerso (JONG; BIRMINGHAM, 1992), (MIZUNO, 1999), a maioria dos produtos de *G. lucidum* disponíveis no mercado deriva do corpo de frutificação. Entretanto, com o recente aumento na demanda destes produtos, nota-se um interesse em se produzir as substâncias biologicamente ativas de *G. lucidum* por técnicas de

cultivo submerso (YANG; LIAU, 1998a, 1998b), (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999), (FANG; ZHONG, 2002a, 2002b, 2002c), (FANG; TANG; ZHONG, 2002), (KIM et al., 2002), (TANG; ZHONG, 2002a, 2002b), (YANG; KE; KUO, 2000). Este interesse se deve ao fato que cogumelos selvagens de *G. lucidum* são raramente encontrados na natureza e o seu cultivo tradicional realizado em troncos de árvores ou sacos com serragem leva meses (MIZUNO et al., 1995), (MAYZUMI; OKAMOTO; MIZUNO, 1997). Além disso, estas técnicas tradicionais não garantem um produto padronizado uma vez que é difícil de controlar as condições durante o processo e as variações na composição dos substratos utilizados interfere na composição do produto final. Por outro lado, quantidades satisfatórias de micélio e produtos podem ser obtidas após poucas semanas de cultivo submerso.

A maioria dos estudos de cultivo submerso com *G. lucidum* vem sendo realizada em escala laboratorial e grande parte destes estudos utiliza frascos de erlenmeyer como biorreator. Nestas condições, diversos frascos são cultivados de forma simultânea sendo imprescindível a reprodutibilidade de resultados entre todos os frascos. O inóculo é uma das etapas mais críticas para a obtenção de resultados representativos e confiáveis, mas, infelizmente, esta etapa do processo recebe pouca atenção por parte dos pesquisadores e os métodos empregados até o momento podem ser questionados sob o ponto de vista da reprodutibilidade. Desta forma, boa parte desta dissertação é dedicada ao estudo da morfologia e fisiologia de *G. lucidum* durante o preparo do inóculo e como isto pode auxiliar no desenvolvimento de uma estratégia de inóculo que seja confiável e reprodutível.

A última parte desta dissertação trata da cultivo principal, buscando-se nesta fase uma maior produção de exopolissacarídeos. Para isso avaliou-se o efeito da concentração do inóculo estudado anteriormente e a alimentação de quantidades adicionais de glucose durante o processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA¹

Esta revisão foca como as técnicas de cultivo têm sido usadas para a obtenção de ácidos ganodéricos (AG), exopolissacarídeos (EPS) e intrapolissacarídeos (IPS). Tanto o cultivo em meio líquido como o cultivo em estado sólido são usados, mas muito mais atenção tem sido dada ao cultivo em meio líquido. Além da revisão sobre os vários aspectos das estratégias de cultivo usadas com *G. lucidum*, este capítulo também traz uma análise crítica dos métodos utilizados para o monitoramento do crescimento e formação dos produtos.

2.1 CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma lucidum*

A vantagem da cultivo submerso sobre o cultivo tradicional de cogumelos é o tempo despendido para a obtenção do produto de interesse. Enquanto a produção de corpos de frutificação leva de 3 a 5 meses, quantidades razoáveis de ácidos ganodéricos e polissacarídeos podem ser obtidas após 2 ou 3 semanas de cultivo submerso (TANG; ZHONG, 2002b).

Uma lista de vários estudos de cultivo submerso com o fungo *Ganoderma* pode ser vista na tabela 1 (ver página 25). Há apenas um único relato sobre cultivo em larga escala, no qual a espécie *G. tsugae* foi cultivada em tanques de 20 toneladas. Todos os estudos com *G. lucidum* foram realizados em volumes de 10 L ou menos. Aproximadamente metade dos estudos foi conduzida em erlenmeyers e a outra metade em biorreatores. A vantagem do uso de biorreatores é a facilidade de se controlar as condições ambientais como temperatura, aeração e pH.

As fermentações submersas com *G. lucidum* têm sido realizadas com diferentes objetivos. Algumas visam simplesmente a produção de biomassa, sem considerar a sua composição. Outras buscam maximizar a produção de polissacarídeos e ácidos ganodéricos verificando como as diferentes variáveis interferem na produção.

¹ Esta revisão foi aceita para publicação em Food Technology and Biotechnology (ver ADENDO).

Os melhores rendimentos relatados até o momento foram de 22.1 g/L para biomassa (TANG; ZHONG, 2002a), 1,71 g/L para EPS (YANG; LIAU, 1998b), 2,49 g/L para IPS (TANG; ZHONG, 2002b) e 582 mg/L para AG (FANG; ZHONG, 2002c). As cinéticas de crescimento e formação de produto serão discutidas mais adiante.

2.1.1 Manutenção das Culturas

Tubos inclinados contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) são a forma preferida para a manutenção das culturas de *G. lucidum*. Entretanto, diferentes metodologias como culturas em placas podem ser seguidas (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999). Deve-se ter um cuidado especial quando se prepara o meio BDA com batatas de origem desconhecida. Resíduos de pesticidas, se presentes, poderão interferir no desenvolvimento dos fungos. Desta forma, marcas comerciais de BDA são recomendadas. Um meio alternativo para a manutenção de culturas é: extrato de malte 1% (m/v), extrato de levedura 4%, D-glucose 0,4% e ágar 2% (SONE et al., 1985).

O tempo de incubação das culturas é de normalmente 7 dias a 24-30 °C. Após este período as culturas podem ser armazenadas a 4 °C. Não foram encontrados estudos sobre a viabilidade das culturas estocadas a esta temperatura.

2.1.2 Inóculo

A produção do inóculo é uma etapa fundamental que de forma geral recebe atenção secundária. Entretanto, o tamanho, viabilidade e homogeneidade do inóculo podem ser cruciais para o controle do desempenho do cultivo subsequente, exigindo uma padronização que permita a reprodutibilidade dos resultados.

No caso dos fungos filamentosos costuma-se usar como inóculo uma suspensão de esporos, os quais podem ser facilmente produzidos. Esta estratégia não é usualmente adotada para os macrofungos como *Ganoderma*, pois os esporos são produzidos somente no corpo de frutificação. Portanto, inóculos derivados de hifas

devem ser usados para estes organismos. Há duas estratégias principais para o preparo de um inóculo micelial. São estas o cultivo em ágar e o desenvolvimento de uma pré-cultura em cultivo submerso. Embora estas formas de inóculo tenham sido comumente utilizadas, ambas são potencialmente problemáticas, como discutido nos próximos parágrafos.

Quando o volume de meio de cultura a ser inoculado é pequeno, pequenos pedaços de micélio, juntamente com o meio em ágar, podem ser retirados de tubos inclinados ou placas de Petri e colocados diretamente no líquido a ser fermentado (YANG; LIAU, 1998a), (YANG; KE; KUO, 2000). Uma fase *lag* mais longa é esperada nestes casos uma vez que o micélio está sendo transferido de um ambiente sólido para um ambiente líquido. Além disso, uma baixa densidade de biomassa é alcançada em inóculos preparados desta forma. Infelizmente, há pouca informação disponível sobre a adaptação de *G. lucidum* e a sua cinética de crescimento nas fases iniciais de cultivo. É também importante frisar que, se um estudo comparativo será realizado em vários biorreatores ao mesmo tempo, os pedaços de micélio deverão ter um tamanho padronizado e deverão ser retirados de uma mesma distância radial em uma placa de Petri. Desta forma pode-se garantir que os diferentes biorreatores receberão aproximadamente a mesma quantidade de micélio no mesmo estágio de desenvolvimento.

Quando grandes volumes de meio de cultura são inoculados, o inóculo é normalmente o volume total ou uma alíquota de uma pré-cultura desenvolvida em cultivo submerso (YANG; LIAU, 1998b), (FANG; ZHONG, 2002a). Nestes casos é possível padronizar o tamanho do inóculo baseando-se na massa seca de micélio por litro de meio de cultivo. A tabela 1 mostra que freqüentemente os pesquisadores simplesmente usam uma pré-cultura em um volume que representa uma dada percentagem do volume final de meio de cultura, mas não reportam a concentração de micélio deste inóculo.

Quando alíquotas são removidas de uma cultura para inocular vários biorreatores a homogeneidade do inóculo pode ser promovida por um tratamento prévio da cultura em um triturador (YANG; LIAU, 1998a). Entretanto, não há estudos

sobre os danos que este procedimento pode causar ao micélio e quais as conseqüências para o crescimento no cultivo subsequente.

Em geral as condições nutricionais e ambientais usadas para a pré-cultura são as mesmas daquelas usadas para o cultivo principal, resultando em uma fase lag mais curta. FANG e ZHONG (2002a), entretanto, utilizaram sacarose como fonte de carbono nas suas pré-culturas e glucose nas fermentações. Estes autores não explicaram porque procederam desta forma. TANG e ZHONG (2002b), por sua vez, relatam que o emprego da sacarose resulta em uma densidade celular menor do que aquela proporcionada pela glucose. Possivelmente o fato de o micélio cultivado em sacarose ser composto por hifas mais curtas contribui para a retirada de alíquotas (que servirão de inóculo) mais homogêneas e padronizadas.

2.1.3 Meios de Cultura

Todos os estudos reportados na tabela 1 envolvem a adição de uma ou mais fontes complexas de carbono e nitrogênio como extrato de levedura, peptona e extrato de malte. Alguns estudos comparam meios contendo estas fontes complexas com meios definidos, nos quais são utilizadas somente fontes únicas de carbono e nitrogênio, além de outros sais. Apesar de os resultados destes estudos não terem sido apresentados, os autores relatam que o crescimento é maior quando fontes complexas são usadas. Na maioria dos trabalhos utilizou-se extrato de levedura e peptona, de forma isolada ou combinada, em concentrações de 1 a 5 g/L. Substâncias que fazem parte destas fontes complexas de nutrientes podem inibir o crescimento quando presentes em níveis elevados. Um exemplo disto é a inibição no crescimento celular causada pela peptona quando usada em concentrações superiores a 10 g/L (FANG; ZHONG, 2002b). É interessante relatar também que a vitamina B1 a 0,05 g/L é comumente adicionada, mesmo que peptona e extrato de levedura já estejam presentes (tabela 1).

Além do uso de fontes complexas de nutrientes, todos os autores empregam um açúcar como fonte principal de carbono. Entretanto, os estudos não têm sido

suficientemente sistemáticos para determinar a melhor fonte de carbono. A maioria dos cultivos foi realizada com glucose e alguns com lactose (tabela 1). O único estudo que avalia as diferentes fontes de carbono foi o de TANG e ZHONG (2002b), o qual comparou sacarose, glucose, maltose e lactose. Os autores afirmaram que a lactose foi o melhor açúcar para o crescimento celular e produção de componentes como IPS e AG. Entretanto, uma análise estatística dos resultados, usando o teste *t* de Student com $p = 0,05$, sugere que a produtividade de biomassa é melhor com maltose, que a produtividade de IPS com lactose não é significativamente melhor que a obtida com maltose e que a produtividade de AG não é significativamente maior com lactose do que com glucose.

2.2 EFEITOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO NO CRESCIMENTO E NA FORMAÇÃO DE PRODUTOS

As condições ótimas de processo variam se o produto desejado for biomassa, IPS, EPS ou AG. A interação entre vários fatores influencia a produtividade destes compostos. Os efeitos de fatores como morfologia do fungo, concentração inicial de açúcar, agitação, aeração, temperatura, pH, densidade do inóculo e adição de ácidos graxos serão discutidos na sequência.

2.2.1 Morfologia

A morfologia do micélio e o metabolismo de *G. lucidum* estão relacionados. O crescimento do micélio em culturas em erlenmeyer sob agitação ocorre na forma de *pellets*, que são agregados esféricos de hifas constituintes de uma ou mais colônias. A produtividade relativa de vários metabólitos depende do tamanho destes *pellets* (FANG; ZHONG, 2002b, 2002c); (FANG; TANG; ZHONG, 2002). O rendimento de AG, por exemplo, é maior em *pellets* grandes do que em *pellets* pequenos. Isto porque devido à dificuldade com que o oxigênio difunde para o interior do *pellet*, quanto maior o tamanho deste, maior a quantidade de biomassa no seu interior que está

deficiente de oxigênio e a limitação deste gás parece estimular a produção de AG pelas células. Por outro lado, as concentrações de IPS são mais baixas em *pellets* maiores.

O tamanho dos *pellets* é influenciado por variáveis como concentração de açúcar no meio, densidade do inóculo e intensidade e tipo de agitação. Infelizmente, os vários estudos de morfologia simplesmente descrevem os efeitos após a mudança de uma variável e não propõe explicações sobre os mecanismos pelos quais a causa leva ao efeito.

2.2.2 Concentração Inicial de Açúcar no Meio

FANG e ZHONG (2002b) sugeriram que a diminuição na velocidade de crescimento de *G. lucidum* observada com o aumento da concentração inicial de glucose acima de 35 g/L foi devido a um aumento na pressão osmótica do meio. Uma outra observação interessante foi que os valores mais elevados do consumo específico de oxigênio foram observados em concentrações de açúcar mais elevadas. Entretanto, o rendimento de biomassa, em massa seca de células por quantidade de açúcar, diminuiu linearmente de 0,58 g-micélio seco/g-açúcar a 20 g/L de glucose para 0,35 g-micélio seco/g-açúcar a 60 g/L de glucose. Estes resultados podem levar a crer que em concentrações mais altas de açúcar boa parte da fonte de carbono não é convertida em biomassa, mas eliminada na forma de CO₂ ou desviada para a síntese de algum metabólito extracelular (FANG; ZHONG, 2002b).

A concentração inicial de açúcar influencia o tamanho dos *pellets*. FANG e ZHONG (2002b) observaram a distribuição dos tamanhos dos *pellets* em culturas obtidas com diferentes concentrações iniciais de glucose. *Pellets* com diâmetro menor que 1,2 mm predominaram quando a concentração inicial de glucose foi de 50 e 65 g/L. Por outro lado, *pellets* com diâmetro maior que 1,6 mm predominaram em concentrações iniciais de 20 g/L de glucose.

Uma vez que a presença de *pellets* maiores proporciona maiores quantidades de AG e menores quantidades de IPS e o tamanho dos *pellets* é afetado pela concentração inicial de açúcar no meio, as condições do cultivo podem ser manipuladas para

aumentar a quantidade de um ou outro produto na biomassa obtida. Entretanto, o rendimento total de um produto desejado não depende somente do seu conteúdo presente na biomassa, mas também do rendimento final de biomassa. Por exemplo, o conteúdo de AG no micélio foi maior com uma concentração inicial de glucose de 20 g/L do que com uma concentração inicial de 50 g/L. Apesar disto, a alta densidade celular obtida a 50 g/L foi suficientemente alta para dar um maior rendimento de AG em base volumétrica (FANG; ZHONG, 2002b).

2.2.3 Agitação e Aeração

Uma agitação ideal representa um equilíbrio entre a transferência de oxigênio para o meio e as forças de cisalhamento, sendo que ambas aumentam com o aumento da agitação. YANG e LIAU (1998b), testando um intervalo de agitação de 50 a 250 rpm em frascos de erlenmeyer em agitadores orbitais, obtiveram as mais altas densidades celulares a 100 rpm, mas o maior rendimento de EPS ocorreu a 150 rpm. Os autores sugeriram que as mais altas velocidades favoreceram a produção de EPS porque elas diminuíram a adsorção dos exopolissacarídeos à parede celular, proporcionando assim, um estímulo para uma maior síntese de EPS. Entretanto, não foi proposto um mecanismo pelo qual este estímulo ocorreria.

Embora YANG e LIAU (1998a, 1998b) realizaram seus estudos com uma velocidade de agitação constante durante todo o cultivo, o aumento da viscosidade resultante de fatores como o aumento das concentrações de biomassa e EPS e as alterações morfológicas do micélio, podem fazer com que seja necessário um aumento da velocidade de agitação durante o cultivo. Por exemplo, em um biorreator provido de dois agitadores de seis lâminas, TANG e ZHONG (2002a, 2002b) começaram o cultivo com uma velocidade de agitação de 100 rpm, mas aumentaram a velocidade para 250 rpm em um experimento e 180 rpm em outro.

Como visto na tabela 1, a agitação em biorreatores é proporcionada principalmente por dispositivos do tipo turbina, embora há algumas referências sobre o uso de fermentadores em que a agitação é proporcionada pela emissão de bolhas de ar

no fundo da dorna (fermentadores do tipo *air-lift*). Nestes casos a agitação pode causar menos cisalhamento sobre o micélio se comparado com o uso de turbinas (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999).

Não é simples avaliar os efeitos da aeração e da agitação de forma independente. A eficiência da transferência de oxigênio não depende somente do *design* e da operacionalidade do sistema de aeração, mas também do método e da velocidade de agitação, os quais foram discutidos anteriormente.

Há apenas dois estudos que buscam especificamente determinar os efeitos da aeração na produção de biomassa e formação de produtos por *G. lucidum*. YANG e LIAU (1998b) compararam diferentes tamanhos de frascos de erlenmeyer com e sem chicanas (*baffles*) e o uso de diferentes taxas de aeração em um biorreator. A tensão de oxigênio dissolvido (TOD) não foi monitorada nestes estudos. Já TANG e ZHONG (2003) monitoraram a TOD em seu estudo e relataram que a produção de EPS foi maior a uma TOD de 10% do que a uma TOD de 25%. O conteúdo de IPS e AG na biomassa também foi mais alto em uma TOD de 10% embora a maior concentração de biomassa alcançada em uma TOD de 25% fez com que, em termos volumétricos, a produção de IPS e AG fosse maior neste caso. O resultado para IPS não concorda com a observação, colocada anteriormente, de que as concentrações de IPS são menores em *pellets* maiores devido a pouca oxigenação (FANG; ZHONG, 2002b, 2002c); (FANG; TANG, ZHONG, 2002).

2.2.4 Temperatura

Como pode ser visto na tabela 1, as fermentações com *G. lucidum* têm sido realizadas em temperaturas que variam de 25 a 35 °C, sendo que a maioria dos estudos foram conduzidos a 30 °C. O efeito da temperatura no crescimento e produção de polissacarídeos e ácidos ganodéricos não tem sido muito estudado. Tanto a produção de polissacarídeos como o crescimento são favorecidos em temperaturas entre 30 e 35 °C, sendo drasticamente reduzidos acima e abaixo deste intervalo (YANG; LIAU,

1998a, 1998b). Não existe informação disponível sobre o efeito da temperatura na produção de ácidos ganodéricos.

2.2.5 pH

Poucas informações podem ser obtidas dos estudos em erlenmeyers uma vez que o pH não foi normalmente controlado ao longo do cultivo. Assim, as interpretações são limitadas à influência do pH inicial no crescimento e produção de polissacarídeos.

Em um estudo, perfis similares de pH foram obtidos após o quarto dia de cultivo, mesmo com um valor inicial variando entre 3,5 e 7,0. Durante os primeiros quatro dias o pH caiu para 3,2 e então permaneceu constante por uma semana. Somente em torno do 10º ao 14º dia, quando a glucose estava quase exaurida, é que o pH rapidamente subiu para 7,0. Quando a glucose foi adicionada no 8º dia e sua concentração no meio foi aumentada em 5 a 10 g/L, o pH permaneceu praticamente constante até o 14º dia. Os autores destes experimentos sugerem que o consumo relativamente alto de glucose pode resultar na produção de ácidos orgânicos que mantêm o valor de pH baixo, entretanto eles não realizaram nenhuma análise para comprovar esta hipótese (FANG; ZHONG, 2002a). O mesmo perfil de mudança de pH foi observado em biorreatores sem o controle de pH (HABIJANIC et al., 2001), (TANG; ZHONG, 2002a).

Apesar de que o perfil de pH foi quase o mesmo após o 4º dia, as diferenças no seu valor inicial resultaram em diferenças no crescimento celular e na produção de metabólitos. Os rendimentos mais altos foram obtidos com os pH iniciais de 6,5 para biomassa, 5,5-6,5 para AG, 5,5-7,0 para IPS e 3,5-4,5 para EPS (FANG; ZHONG, 2002a).

Os estudos de FANG e ZHONG (2002a) foram realizados em um meio composto por glucose, peptona e extrato de levedura. Em outros estudos, o pH inicial ótimo para a formação de biomassa dependeu da fonte principal de nitrogênio usada,

sendo 4,0 para o cloreto de amônio e 5,0 para o extrato de malte (YANG; LIAU, 1998a).

Resultados distintos foram obtidos quando o pH foi controlado em um biorreator. O pH mantido em 3,0 resultou em maior densidade celular que o pH mantido em 6,0. Para a produção de exopolissacarídeos os resultados foram opostos, sendo que o cultivo realizado em pH constante de 6,0 proporcionou maior rendimento que o cultivo realizado em pH 3,0 (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999). Estes autores sugeriram que a melhor produção de EPS quando o pH foi controlado em 6,0 ocorreu devido à manutenção do crescimento em forma de *pellets*. Em um cultivo iniciado em pH 6,0 mas sem controle do pH, o pH cai para 2,6 e a morfologia muda de *pellet* para a forma filamentosa nos últimos estágios do cultivo, levando os autores a sugerir que o pH influencia a morfologia a qual, por sua vez, afeta a produção de EPS. Entretanto, a predominância da forma filamentosa não é necessariamente a responsável pela baixa produção de EPS. Ambos os efeitos podem ser conseqüências independentes da diminuição do pH de 6,0 para 2,6. De qualquer forma os resultados para a produção de EPS apresentados por estes autores podem ser questionados uma vez que o método de quantificação dos polissacarídeos utilizado é duvidoso. Este assunto será discutido mais adiante.

2.2.6 Efeito da Densidade do Inóculo

O tamanho do inóculo influencia o perfil do cultivo. Inóculos com densidade de 70 a 760 mg de massa seca por litro resultaram em uma fase *lag* de 1 dia, enquanto uma fase *lag* de 4 dias foi observada com um inóculo de densidade de 5 mg de massa seca por litro (FANG; TANG; ZHONG, 2002). A densidade celular final também é afetada, embora não muito, pela densidade do inoculo. A densidade celular aumentou de 13,6 g-massa seca/L a uma densidade de inóculo de 70 mg-massa seca/L para 15,7 g-massa seca/L a uma densidade de inóculo de 330 mg-massa seca/L, diminuindo em seguida para 14,2 g-massa seca/L a uma densidade de inóculo de 670 mg-massa seca/L. Como já dito, a produção de IPS e EPS é favorecida em *pellets* de menor

tamanho. já a produção de AG é favorecida em *pellets* maiores. A importância disto é que a densidade do inóculo influencia o tamanho dos *pellets*. Em um cultivo em que a densidade do inóculo foi de 670 mg de massa seca por litro, 68,3% dos *pellets* tiveram um diâmetro menor que 1,2 mm, mas quando a densidade do inóculo foi de 70 mg de massa seca por litro, 91,0% dos *pellets* apresentavam um diâmetro maior que 1,6 mm (FANG; TANG, ZHONG, 2002). Portanto, é possível concluir que altas densidades de inóculo favorecem a produção de intra e exopolissacarídeos e baixas densidades de inóculo favorecem a produção de ácidos ganodéricos como consequência da distribuição do tamanho dos *pellets* no meio de cultivo.

2.2.7 Efeito de Óleos Vegetais e Ácidos Graxos

A formação de espuma é uma característica indesejável em muitas fermentações submersas. A espuma causa um aumento do volume de trabalho, interfere no monitoramento e no controle das condições de cultivo e faz com que a recuperação do produto se torne mais difícil. A adição de anti-espumantes pode ser necessária em fermentações em larga escala de *G. lucidum* (YANG; KE; KUO, 2000).

Vários óleos de plantas que podem ser usados como anti-espumantes podem também favorecer o crescimento de *G. lucidum*. Os efeitos dos óleos de soja, amendoim, açafrão, milho, girassol e oliva foram investigados em cultivo submerso em concentrações de 1%, presumivelmente (v/v). Todos os óleos testados estimularam o crescimento celular, sendo que a maior densidade celular foi obtida com o óleo de oliva (YANG; KE; KUO, 2000). YANG, KE e KUO propuseram que o estímulo é devido à uma incorporação parcial dos lipídeos na membrana celular, sendo que este processo facilitaria a captação dos nutrientes do meio. Por outro lado, comparada com as culturas que não receberam adição de qualquer óleo, a produção de exopolissacarídeos foi maior com o óleo de açafrão, levemente inibida com óleo de soja e sem efeito significativo com os demais óleos.

Para fermentações com *Ganoderma* em biorreatores apenas um trabalho reporta o uso de uma marca comercial de anti-espumante em uma concentração de 0,5%,

presumivelmente (v/v) (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y., 1999). HABIJANIC e BEROVIC (2001) empregam óleo de oliva a 2% (v/v), porém justificam o uso deste componente apenas como fonte de nutrientes. O vantagem do uso de óleos vegetais é o seu baixo custo e a possibilidade de aumentar a densidade celular. Por outro lado, a composição de um óleo vegetal pode variar dependendo da origem da planta e da colheita, sendo que pequenas diferenças na composição dos ácidos graxos pode levar a diferenças significativas no crescimento celular.

O efeito de ácidos graxos, como os ácidos esteárico, oléico, palmítico e linoléico na formação de biomassa e polissacarídeos foi também avaliado em concentrações que variaram de 0,05 a 0,25% (m/v). Nenhuma correlação pôde ser feita entre os níveis de estimulação do crescimento, o tamanho da cadeia carbônica e a frequência de insaturações. O uso de ácido oléico resultou na maior densidade celular observada, seguida pelo emprego de ácido palmítico e ácido esteárico. O ácido linoléico mostrou uma forte inibição do crescimento e surpreendeu YANG, KE e KUO (2000) que apontaram este ácido graxo como o principal componente do óleo de açafrão, o qual estimula o crescimento e a produção de exopolissacarídeos. Estes autores sugeriram que outros componentes presentes no óleo de açafrão podem agir positivamente, mascarando os efeitos inibitórios do ácido linoléico. Entretanto, há dois tipos de óleo de açafrão, um rico em ácido oléico e outro rico em ácido linoléico (NEY; LASEKAN; KIM, 1989) e YANG, KE e KUO não especificaram qual dos dois óleos usaram em seus experimentos.

A produção de exopolissacarídeos em culturas suspensas foi mais fortemente estimulada pela adição de ácido palmítico, seguida por ácido oléico e ácido esteárico em concentrações inferiores a 0,1%. O ácido linoléico se mostrou um inibidor, assim como o ácido esteárico em concentrações acima de 0,1%. A resposta a ácidos graxos pode diferir de acordo com o estado morfológico da cultura. Quando o micélio foi crescido sobre a superfície de uma esponja de poliuretano imersa no meio, o ácido palmítico foi benéfico para a produção de exopolissacarídeos, mas os ácidos oléico e esteárico não levaram a nenhuma mudança significativa nas concentrações testadas.

Diferentemente, o ácido cáprico, testado somente nas culturas sobre a esponja de poliuretano, foi um forte inibidor.

2.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE PRODUTO

Na maioria dos estudos nos quais o perfil do cultivo foi apresentado, as concentrações de biomassa, polissacarídeos e ácidos ganodéricos aumentou de forma aproximadamente linear nas fases de crescimento e produção. A velocidade de crescimento linear (r_{BM}) e as velocidades de produção linear para EPS, IPS e AG (r_{EPS} , r_{IPS} e r_{AG} , respectivamente) foram calculadas por regressão linear das regiões lineares dos perfis apresentados pelos autores. Não foi possível analisar os perfis de todos os cultivos apresentados na tabela 1 porque muitos autores não apresentaram gráficos, ou se apresentaram, estes possuíam poucos pontos antes da fase estacionária. A velocidade de crescimento linear variou de 0,3 a 2,8 g/(L.d), enquanto as velocidades de produção linear variaram entre 0,02 e 0,6 g/(L.d) para EPS, entre 0,05 e 0,25 g/(L.d) para IPS e entre 11 e 56 mg/(L.d) para AG. LEE, K. M.; LEE, S. Y. e LEE, H. Y. (1999) obtiveram uma velocidade de produção linear de EPS de 4,2 g/(L.d), entretanto a confiabilidade deste valor é questionável devido à metodologia rudimentar utilizada para a quantificação dos polissacarídeos.

2.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO

Cinco estratégias principais vêm sendo utilizadas para o cultivo de *G. lucidum*. A idealização destas estratégias surgiu a partir do comportamento da *Ganoderma* sob diferentes condições ambientais. Todas as técnicas de cultivo descritas abaixo foram realizadas em escala laboratorial e o conhecimento gerado a partir de cada uma delas contribuirá para o aumento da escala do processo.

2.4.1 Cultivo em Batelada

O cultivo em batelada é a mais simples das técnicas relatadas. A maioria dos estudos tem sido realizada em erlenmeyers (YANG; LIAU, 1998a, 1998b), (YANG; KE; KUO, 2000), (FANG; TANG; ZHONG, 2002), (FANG; ZHANG, 2002b), embora alguns tenham sido realizados em biorreatores (YANG; LIAU, 1998b), (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999), (HABIJANIC et al., 2001), (KIM et al., 2002), (TANG; ZHONG, 2002b, 2003).

2.4.2 Cultivo em Batelada Alimentada

A estratégia básica no cultivo em batelada alimentada é a adição de parte dos nutrientes durante o cultivo ao invés de simplesmente adicionar todo o conteúdo de nutrientes no início do processo. Desta forma o microorganismo é exposto a baixas concentrações de um determinado nutriente que pode causar inibição do crescimento ou da formação de um produto, quando presente em altas concentrações no meio. Neste caso o crescimento e a formação de um produto pode ser potencialmente estendida por longos períodos em relação aos cultivos em batelada simples.

TANG e ZHONG (2002b) investigaram o cultivo em batelada alimentada com *G. lucidum*, motivados pela observação de que concentrações de lactose acima de 35 g/l foram prejudiciais para a produção de ácidos ganodéricos. O cultivo foi iniciado com 35 g/L. A lactose foi monitorada *off-line*, e quando sua concentração caiu para um valor entre 5 e 10 g/L, uma solução de lactose, em um volume igual a 10% do volume de trabalho do biorreator, foi adicionada para aumentar sua concentração em 15 g/L (TANG; ZHONG, 2002a, 2002b). O rendimento final de ácido ganodérico, exopolissacarídeos e intrapolissacarídeos foi 11, 43 e 48% maior, respectivamente, do que os rendimentos obtidos em cultivo por batelada simples (TANG; ZHONG, 2002b). Portanto a alimentação de lactose causou um maior estímulo na produção de polissacarídeos do que na produção de ácidos ganodéricos.

Em outro experimento em erlenmeyers usando glucose como fonte de carbono, a produção de EPS foi 124% maior ao se adicionar a glucose após o 8º dia de cultivo, quando a concentração desta estava abaixo de 2,0 g/L, aumentando-a em 10 g/L (FANG; ZHONG, 2002a). Nenhuma informação foi dada sobre a produção de IPS e AG.

2.4.3 Controle de pH em Duas Etapas

Baseado na observação de que um pH 3,0 constante levou a um aumento do crescimento do micélio e um pH 6,0 constante levou a uma alta produção de polissacarídeo, propôs-se um cultivo com controle de pH em duas etapas. Neste cultivo a massa seca de biomassa aumentou linearmente durante os primeiros 4 dias, sendo que o pH inicial foi de 3,0 e alterado propositadamente para 6,0 no segundo dia de cultivo (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y, 1999). Embora a biomassa obtida não tenha sido tão grande (8,23 g de massa seca /L) a produção de EPS foi a mais alta já reportada na literatura (20,04 g/L). Entretanto, o fato de que os polissacarídeos foram secados por calor e quantificados pelo método gravimétrico faz com que estes resultados sejam considerados preliminares, devendo ser confirmados por métodos mais específicos para dosagem de polissacarídeos. Portanto, não é possível comparar estes resultados com resultados mais específicos obtidos por outros pesquisadores.

2.4.4 Cultivo em Dois Estágios

O fato de que a produção de ácidos ganodéricos foi favorecida em baixas tensões de oxigênio levou FANG e ZHONG (2002c) a realizar um cultivo em erlenmeyers em dois estágios. O primeiro estágio foi realizado com agitação em agitadores orbitais. Após 4, 8 ou 12 dias a agitação foi interrompida e a cultura permaneceu estática até o 24º dia. Uma cultura controle foi mantida sob agitação desde o início até o final do processo. Nas culturas estáticas a glucose foi consumida mais lentamente e convertida em biomassa mais eficientemente. A maior densidade

celular foi obtida com 4 dias de agitação seguidos por 12 dias de cultivo estático. Infelizmente nenhum frasco foi mantido estático desde o momento do inóculo. Resultados de um experimento como este contribuiriam para um melhor entendimento sobre os efeitos da agitação no crescimento de *G. lucidum*.

A maior produção de ácidos ganodéricos já reportada na literatura (582 mg/L no 12º dia) foi obtida nas culturas que foram agitadas somente nos primeiros 4 dias. A produção de AG foi quase o dobro do que a obtida nas culturas agitadas continuamente. Uma camada espessa de micélio foi observada nas culturas estáticas, e apesar de que os autores não dizem se esta camada estava na superfície ou submersa no meio, a sua grande espessura pode ter restringido a difusão do oxigênio para o interior da camada e as baixas concentrações de oxigênio foram provavelmente o estímulo para a produção de AG. Esta camada espessa de micélio não foi observada nas culturas agitadas durante os primeiros 12 dias e então mantidas estáticas por mais 12 dias. Neste caso a produção de AG não foi significativamente maior se comparada com a produção obtida a partir das culturas agitadas por todo o tempo.

2.4.5 Cultura Imobilizada

Um experimento interessante foi conduzido por YANG, KE e KUO (2000), que introduziram uma esponja de poliuretano no meio de um cultivo submerso em erlenmeyer. O micélio aderiu à superfície da esponja e quase nenhum micélio livre foi encontrado em suspensão. A densidade celular e a quantidade de polissacarídeo obtida foram notavelmente maiores neste tipo de culturas do que em culturas sem a presença da esponja. Estes resultados podem indicar que a morfologia do micélio adotada sobre um suporte sólido é mais favorável para o crescimento celular e formação de polissacarídeos. A secreção de polissacarídeo ocorreu lentamente e após 2 a 3 semanas de cultivo uma grande quantidade de polissacarídeos estava adsorvida ao suporte. Como sugerido pelos autores o uso de esponjas pode ser útil para a recuperação de

biomassa e produto. Não há informação disponível sobre a produção de ácidos ganodéricos em culturas imobilizadas.

2.4.6 Cultivo em Estado Sólido

Existe pouca informação disponível sobre a produção de micélio de *G. lucidum* em cultivo em estado sólido. A maioria dos estudos tem focado na formação de corpos de frutificação com menos interesse na obtenção de biomassa micelial e seus produtos. O único estudo publicado foi realizado em biorreatores de tanques horizontais agitados com um volume de trabalho de 30 L. As condições do processo foram controladas da seguinte forma: temperatura 30 °C, aeração 2 L/min e agitação 80 rpm durante 2 minutos a cada dois dias durante os primeiros sete dias, e a cada dia durante o restante do cultivo (HABIJANIC; BEROVIC, 2000).

Os efeitos da umidade inicial foram avaliados neste estudo. Pelo menos 74% de umidade (massa de água/massa seca) foi necessário para proporcionar uma taxa satisfatória de crescimento celular e produção de exopolissacarídeos. Esta quantidade de água correspondia a uma atividade de água de 0,85.

O substrato usado neste cultivo em estado sólido era composto de serragem de faia, óleo de oliva, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e água destilada. A grande vantagem do cultivo em estado sólido sobre outras técnicas é a possibilidade de se obter um produto mais concentrado usando um substrato barato como um resíduo agro-industrial sem nenhum pré-tratamento ou enriquecimento. Por outro lado, o uso de um meio indefinido pode levar a dificuldades no processo de purificação, quando necessário. Por esta razão esta técnica de cultivo seria mais apropriada para a produção de ração animal com propriedade imunoestimulante, uma vez que neste caso o substrato e o micélio seriam utilizados juntos como produto sem ser necessária a purificação dos compostos bioativos.

O conteúdo de exopolissacarídeos no substrato sólido fermentado aumentou rapidamente durante os primeiros 7 dias, permanecendo relativamente constante até o 21º dia quando então diminuiu, o que sugere uma degradação destes polímeros. O

período em que ocorreu uma diminuição do conteúdo de polissacarídeos correspondeu ao período em que quantidade de água no sistema caiu significativamente, de valores de 70-80% (m/m) que eram mantidos durante os primeiros 21 dias, para 20% (m/m) no 35º dia. Entretanto, não está claro se há uma relação causa e efeito direta entre estas duas observações.

O mecanismo de controle da produção e consumo de polissacarídeos não é conhecido, entretanto, os autores sugerem que os polissacarídeos extracelulares servem para auxiliar na adesão da hifa à partícula sólida, além de proteger a hifa de danos mecânicos durante a agitação e da dessecação em condições de baixa umidade.

2.5 TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO E ANÁLISE

Nesta seção serão discutidas as principais metodologias usadas para a recuperação de biomassa, ácidos ganodéricos e polissacarídeos de *Ganoderma lucidum*, bem como os procedimentos adotados para a sua quantificação.

2.5.1 Biomassa

Em cultivo submerso a recuperação de biomassa é geralmente realizada por filtração a pressão reduzida ou centrifugação. Quando se pretende quantificar a biomassa de uma amostra, esta é geralmente filtrada através de um papel de filtro de massa conhecida. É reportado o uso de papeis de filtro GF/C Whatman (YANG; KE, KUO, 2000) ou membranas com tamanho de poro padronizado (30 ou 0,45 μm) (FANG; ZHONG, 2002a, 2002b), (KIM et al., 2002). Alguns autores filtram a biomassa, ressuspendem-na em água destilada, centrifugam-na e secam-na até massa constante. A temperatura usada para secar o micélio varia de 50 a 105 °C. Nenhum estudo foi encontrado sobre o efeito da temperatura de secagem sobre a perda de outros componentes celulares voláteis além da água.

A recuperação de biomassa obtida por cultivo em estado sólido é uma tarefa difícil, uma vez que o micélio se adere intimamente às partículas sólidas do substrato.

Desta forma, é normalmente impossível de se determinar a quantidade de biomassa diretamente pelo método gravimétrico. Métodos alternativos utilizados para o acompanhamento do crescimento do micélio estão descritos na literatura. (MITCHELL, 1992).

2.5.2 Ácidos Ganodéricos

Os principais representantes dos terpenóides com atividade biológica produzidos por *G. lucidum* são os ácidos ganodéricos. A extração e determinação destas substâncias é um processo realizado em várias etapas. Primeiramente o micélio seco é submetido à extração por duas vezes com etanol 50% (v/v), sendo que cada extração dura duas semanas. O sobrenadante obtido com as extrações é seco e o resíduo ressuspensionado em água. A solução aquosa é extraída com clorofórmio e a fase aquosa é descartada. Uma solução de NaHCO_3 5 % (w/v) é adicionada à fase clorofórmica e a fase aquosa é coletada e acidificada com HCl até pH menor que 3. Os ácidos ganodéricos são extraídos novamente com uma nova quantidade de clorofórmio, que após separada da fase aquosa é evaporada. O resíduo resultante é ressuspensionado em etanol absoluto e os ácidos ganodéricos são quantificados a 245 nm (FANG; ZHONG, 2002a, 2002b, 2002c), (FANG; TANG; ZHONG, 2002), (TANG; ZHONG, 2002b, 2003). Os autores não fornecem provas de que a fração obtida contém somente ácidos ganodéricos. Eles apenas relatam que os AG presentes no micélio de *G. lucidum* são uma mistura complexa de compostos com grupos carbonila α,β -insaturados, cuja absorbância é máxima entre 230-260 nm (TANG; ZHONG, 2003). Outros ácidos orgânicos poderiam ser extraídos e purificados juntamente com os ácidos ganodéricos embora eles não necessariamente absorvam de forma significativa nesta faixa de comprimento de onda.

2.5.3 Polissacarídeos

O meio de cultivo líquido filtrado, contém exopolissacarídeos que podem ser recuperados por precipitação com 3-4 volumes de etanol 95-96% (v/v). O uso de 2 volumes de acetona também foi relatado (LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y., 1999). Alguns pesquisadores dialisam o meio filtrado antes de adicionar a solução de etanol (FANG; ZHONG, 2002a), (FANG; TANG; ZHONG, 2002), (SONE et al., 1985). Este procedimento elimina pequenas moléculas contaminantes que podem interferir na quantificação dos polissacarídeos. YANG e LIAU (1998b) submeteram o micélio com o meio de cultivo a ultrassonicação por duas horas com a intenção de liberar os polissacarídeos aderidos à célula. Entretanto, eles não mostraram que este tratamento não causou a destruição das células, desta forma é impossível afirmar se IPS e EPS foram quantificados individualmente neste caso.

Os intrapolissacarídeos são usualmente extraídos com uma solução de NaOH 1 N a 60 °C por 1 h. Entretanto, esta não é a única fração de intrapolissacarídeos que pode ser obtida. Outros solventes podem ser empregados para a sua extração, como água quente, oxalato de amônio 1%, e NaOH 5% (HABIJANIC et al., 2001).

No cultivo em estado sólido a fração de exopolissacarídeos não está dissolvida em uma fase líquida. Para que esta fração possa ser recuperada, o substrato cultivado, que também contém micélio, deve ser extraído com água à temperatura ambiente. A extração de polissacarídeos com água fervente por 5 h foi descrita para a cultivo em estado sólido (HABIJANIC; BEROVIC, 2000), entretanto um procedimento como este leva a extração de intra e exopolissacarídeos.

O principal método usado para a quantificação dos polissacarídeos se baseia na reação do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), que é uma reação geral para carboidratos. Desta forma, outras moléculas além de polissacarídeos, como monossacarídeos e oligossacarídeos, dão uma resposta falso-positiva para este ensaio. A estratégia de diálise do meio de cultivo antes da precipitação da fração polissacarídica ou a lavagem do precipitado com etanol elimina moléculas pequenas que estejam presentes. A maioria dos trabalhos não menciona a quantidade de proteína

na fração polissacarídica. Além disso, alguns pesquisadores tratam o precipitado obtido com etanol ou acetona como se fosse uma fração polissacarídica pura. Eles simplesmente pesam o precipitado seco e reportam-no como se fosse uma massa de polissacarídeos livre de contaminantes.

Uma atenção especial deve ser tomada quando se usa um meio de cultura de composição indefinida. Substratos como extrato de levedura, peptona e resíduos sólidos usados no cultivo em estado sólido contribuem com uma série de componentes que podem ser extraídos e quantificados com os polissacarídeos produzidos pelo organismo cultivado.

2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A revisão da literatura mostra que ainda há pouca informação sobre o uso de técnicas avançadas de cultivo para a obtenção de micélio, ácidos ganodéricos e polissacarídeos de *Ganoderma lucidum*. Como discutido anteriormente, muitas das informações apresentadas nos artigos científicos podem ser questionadas devido à metodologia experimental adotada, o que leva a necessidade de repetição de muitos experimentos utilizando uma metodologia mais adequada e específica para cada caso. Além disso, para o desenvolvimento de processos em larga escala que sejam economicamente vantajosos, é necessário que se conheça mais a fundo o microrganismo e a forma com que este responde a mudanças no ambiente.

Os pontos que merecem ser investigados com maior profundidade e que resultarão em um conhecimento que contribuirá para o desenvolvimento de processos comerciais para a obtenção de biomassa, ácidos ganodéricos e polissacarídeos de *Ganoderma lucidum* são:

- a) inóculo: as formas de inóculo que vêm sendo utilizadas são questionáveis sob o ponto de vista da reprodutibilidade. O desenvolvimento de uma forma de inóculo que seja reprodutível é imprescindível para a realização de estudos simultâneos em diversos biorreatores;

- b) nutrição: nenhum estudo amplo foi realizado para avaliar a utilização de diferentes nutrientes, a preferência destes pelo fungo *Ganoderma lucidum* e o efeito que causam na cinética de crescimento e produção de ácidos ganodéricos e polissacarídeos;
- c) modo de cultivo: os resultados obtidos por alguns autores levam a crer que o uso de suportes sólidos inertes em cultivo submerso e o cultivo em estado sólido sejam técnicas promissoras para a produção de biomassa e polissacarídeos, sendo mais vantajosas que o cultivo submerso com cultura suspensa. Entretanto, nenhum estudo sistemático foi realizado para confirmar esta hipótese;
- d) condições do meio: ainda existem lacunas no conhecimento do comportamento deste fungo perante diferentes condições do meio. Exemplos que podem ser dados são os efeitos do pH, aeração e agitação. O estudo do pH está basicamente limitado às variações no pH inicial, pois os experimentos em biorreatores não focaram este tema. Os efeitos da variação da concentração de O₂ dissolvido no meio ainda são pouco conhecidos. Além disso, os efeitos da aeração e agitação não podem ser analisados de forma independente com a metodologia de pesquisa utilizada até o momento;
- e) morfologia: alterações morfológicas que ocorrem durante um processo ou em diferentes condições de cultivo podem ou não ser vantajosas para a obtenção de diferentes produtos. Apesar de já ser explorada por alguns pesquisadores esta é uma área que ainda merece uma atenção especial por não estar totalmente esclarecida;
- f) cinética: não há estudos específicos sobre a cinética de crescimento e produção de polissacarídeos por *Ganoderma lucidum* tanto em cultivo submerso como em cultivo em estado sólido. As informações encontradas na literatura são escassas e em alguns casos, como para a produção de polissacarídeos, não podem ser consideradas devido à metodologia de análise empregada pelos pesquisadores.

(Continua)

TABELA 1 - EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)			Velocidade de produção linear [R ²] (intervalo usado em dias)				
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM (g/(L.d))	EPS (g/(L.d))	IPS (g/(L.d))	AG mg/(L.d)
(YANG; LIAU, 1998a)	Meio A	100 mL em frasco de 500 mL; pH inicial 4,0; 100 rpm em agitador orbital; 30 °C. Inóculo de disco.	5,5 (14)	–	–	–	–	–	–	–
(YANG; LIAU, 1998b)	Meio A	100 mL em frasco de 500 mL; pH inicial 4,0; 100 rpm em agitador orbital; 30 °C. Inóculo*	–	1,71 (7)	–	–	–	–	–	–
(YANG; LIAU, 1998b)	Meio A	1 L em biorreator de 2 L; agitador de 6-lâminas; 200 rpm; pH inicial 4,0; 30 °C; 1 vvm; Inóculo 10% (v/v)	–	1,26 (7)	–	–	–	0,17 [0,85] (2-7)	–	–
(YANG; LIAU, 1998b)	Meio A	Conforme item anterior, mas agitação a 400 rpm. Inóculo 10% (v/v)	–	1,48 (3)	–	–	–	–	–	–
(YANG; LIAU, 1998b)	Meio A	3 L em biorreator de 5L; pH 4,0; 30 °C; 100 rpm; 1 vvm; 7 d. Inóculo*	–	–	–	–	–	–	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A	100 mL em frasco de 250 mL; pH inicial 4,0; 100 rpm em agitador orbital; 30 °C. Inóculo de disco.	2,3 (8)	0,13 (8)	–	–	0,3 [0,84] (2-8)	0,03 [1,00] (4-8)	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + óleo de oliva 1%	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	3,28 (7)	0,16 (7)	–	–	–	–	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + óleo de açafrão 1%	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	2,78 (7)	0,18 (7)	–	–	–	–	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + ácido oleico 1,5	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	4,6 (7)	0,16 (7)	–	–	–	–	–	–

(Continuação)

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)				Velocidade de produção linear [R ²] (intervalo usado em dias)			
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM (g/L.d)	EPS (g/L.d)	IPS (g/L.d)	AG (mg/L.d)
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + ácido palmítico	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	4,4 (8)	0,16 (8)	–	–	0,6 [0,94] (2-8)	0,03 [0,97] (2-8)	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + ácido palmítico	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	3,4 (7)	0,21 (7)	–	–	–	–	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + ácido oléico	100 mL em frasco de 250 mL; pH inicial 4,0; agitador orbital 100 rpm; 30 °C. Esponja de poliuretano como suporte inerte. Inóculo de disco.	8,7 (7)	0,27 (7)	–	–	–	–	–	–
(YANG; KE; KUO, 2000)	Meio A + ácido palmítico	Conforme item anterior. Inóculo de disco.	6,1 (7)	0,32 (7)	–	–	–	–	–	–
(FANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + Glc 35; EL 10; P 5	50 mL em frasco de 250 mL; pH inicial 5,5; 120 rpm em agitador orbital; 30 °C. Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	15,8 (8)	0,62 (8)	0,86 (8)	150 (8)	–	–	–	–
(FANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + Glc 35; EL 5; P 5	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	15,4 (8)	0,81 (8)	0,81 (8)	171 (8)	–	–	–	–
(FANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + Glc 65; EL 5; P 5	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	12,6 (10)	1,08 (10)	0,95 (10)	159 (10)	–	–	–	–
(FANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + Glc 50; EL 5; P 5	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	16,7 (10)	0,85 (10)	1,19 (10)	212 (10)	–	–	–	–

(Continuação)
TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)				Velocidade de produção linear [R ²] (intervalo usado em dias)			
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM (g/L.d)	EPS (g/L.d)	IPS (g/L.d)	AG (mg/L.d)
(FANG; ZHONG, 2002a)	Meio B + Glc 35; EL 5; P 5	Conforme item anterior mas pH inicial 3,5	13,8 (8)	1,02 (14)	0,94 (8)	155 (8)	–	0,08 [0,97] (1-12)	–	–
(FANG; ZHONG, 2002a)	Conforme item anterior	Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L) Conforme item anterior mas pH inicial 5,5, Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	15,5 (8)	0,63 (8)	1,06 (8)	193 (8)	–	–	0,15 [0,99] (1-8)	–
(FANG; ZHONG, 2002a)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas pH inicial 6,5 Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	17,3 (8)	0,59 (8)	1,05 (8)	208 (8)	2,3 [0,97] (1-8)	–	–	27 [0,98] (2-8)
(FANG; ZHONG, 2002a)	Conforme item anterior	Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L) 50 mL em frasco de 250 mL; 120 rpm em agitador orbital; 30 °C; 10 g/L de Glc adicionados no d. 8, Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	–	1,41 (14)	–	–	–	0,19 [0,98] (8-12)	–	–
(FANG; ZHONG, 2002c)	*	50 mL em frasco de 250 mL; 120 rpm em agitador orbital; 30 °C; estático após 4 d. Inóculo 10% (v/v) (325 mg-BM/L)	20,9 (16)	–	–	582 (12)	0,9 [0,99] (4-16)	–	–	56 [0,97] (4-12)
(FANG; TANG; ZHONG, 2002)	*	Biorreator*. Inóculo 170 mg-BM/L	15,3 (8)	0,71 (8)	0,79 (8)	267 (8)	–	–	–	36 [1,00] (2-8)
(FANG; TANG; ZHONG, 2002)	*	Biorreator*. Inóculo 330 mg-BM/L	15,7 (8)	0,79 (8)	1,08 (8)	214 (8)	2,8 [0,99] (1-6)	–	–	–
(FANG; TANG; ZHONG, 2002)	*	Biorreator*. Inóculo 670 mg-BM/L	14,2 (8)	0,88 (8)	1,22 (8)	180 (8)	–	0,11 [0,87] (1-8)	0,16 [0,97] (1-8)	–

(Continuação)

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)			Velocidade de produção linear [R ²] (intervalo usado em dias)				
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM g/(L.d)	EPS g/(L.d)	IPS g/(L.d)	AG mg/(L.d)
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + sacarose 35; EL 5; P 5,	50 mL em frasco de 250 mL; pH inicial 5,5; 120 rpm em agitador orbital; 30 °C. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	3,5 (2)	0,63 (dia*)	0,25 (dia*)	40 (dia*)	–	–	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + Glc 35; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	10,1 (10)	0,47 (dia*)	0,97 (dia*)	144 (dia*)	–	–	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + maltose 35; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	12,2 (10)	0,57 (dia*)	1,16 (dia*)	119 (dia*)	–	–	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + lactose 35; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	12,3 (12)	0,53 (dia*)	1,43 (dia*)	180 (dia*)	–	–	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + lactose 35; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	12,3 (12)	0,56 (14)	1,43 (10)	170 (12)	–	–	–	11 [0,98] (2-12)
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + lactose 50; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	13,8 (14)	0,79 (14)	1,65 (12)	110 (14)	–	–	0,11 [0,97] (2-12)	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + lactose 65; EL 5; P 5,	Conforme item anterior. Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	14,4 (14)	0,94 (14)	1,41 (14)	92 (14)	0,81 [0,95] (2-14)	0,06 [0,98] (2-14)	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Meio B + lactose 35; EL 5; P 5,	50 mL em frasco de 250 mL; agitador orbital 120 rpm; 30 °C; lactose adicionada no d. 8, Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	~20 (12)	0,96 (20)	1,97 (16)	258 (20)	–	0,49 [0,98] (8-20)	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas lactose adicionada no d. 10, Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	~20 (14)	0,80 (22)	2,01 (14)	334 (20)	–	–	0,24 [0,96] (10-14)	20 [1,00] (10-20)

(Continuação)

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)				Velocidade de produção linear (intervalo usado em dias)			
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM g/(L.d)	EPS g/(L.d)	IPS g/(L.d)	AG mg/(L.d)
(TANG; ZHONG, 2002b)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas lactose adicionada no d. 12, Inóculo 10% (v/v) (625 mg-BM/L)	~20 (14)	0,76 (18)	1,78 (18)	270 (20)	–	–	–	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Conforme item anterior	2 L em biorreator, 2 agitadores com 6-lâminas; 100-180 rpm; 0,25-0,5 vvm. Inóculo %* (625 mg-BM/L)	16,7 (10)	0,61 (12)	1,68 (20)	178 (10)	–	0,03 [0,96] (4-12)	0,10 [0,95] (4-12)	–
(TANG; ZHONG, 2002b)	Conforme item anterior	Biorreator e condições conforme item anterior. [lactose] aumentada em 15 g/L no d.10, Inóculo %* (625 mg-BM/L)	21,9 (12)	0,87 (20)	2,49 (22)	367 (12)	–	0,02 [1,00] (12-20)	0,06 [0,86] (12-22)	–
(TANG; ZHONG, 2002a)	Conforme item anterior	3,5 L em biorreator com agitação de 100-250 rpm; 30 °C; 0,25-1,0 vvm; pH inicial ~5,5, Inóculo 10% (v/v)	18,4 (10)	0,81 (14)	–	–	1,7 [0,98] (4-10)	0,05 [0,99] (4-14)	–	–
(TANG; ZHONG, 2002a)	Conforme item anterior	Biorreator e condições conforme item anterior mas lactose alimentada no d. 10, Inóculo 10% (v/v)	22,1 (12)	1,25 (16)	–	–	–	0,12 [0,99] (10-16)	–	–
(TANG; ZHONG, 2003)	Meio B + lactose 35; EL 2,5; P 5	3,5 L em biorreator com dois agitadores de 6-lâminas. 30 °C. TOD mantida a 10%. Inóculo*	4,1 (12)	0,70 (12)	0,60 (12)	147 (9)	–	0,05 [1,00] (4-12)	0,05 [0,99] (4-12)	–
(TANG; ZHONG, 2003)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas TOD mantida a 25%. Inóculo*	14,7 (10)	0,60 (12)	1,56 (10)	340 (10)	1,4 [1,00] (4-10)	0,05 [0,99] (4-12)	0,20 [0,98] (4-10)	34 [0,87] (4-10)
(TANG; ZHONG, 2003)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas agitação de 200 rpm, 0,22 L-ar/min ($k_L a = 16,4 \text{ h}^{-1}$). Inóculo*	12,1 (8)	0,97 (13)	1,91 (10)	245 (10)	–	0,06 [0,99] (2-12)	–	–
(TANG; ZHONG, 2003)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas agitação de 200 rpm, 1,75 L-ar/min ($k_L a = 78,2 \text{ h}^{-1}$). Inóculo*	15,6 (10)	0,92 (13)	2,19 (10)	338 (10)	2,1 [1,00] (2-8)	– [0,98] (2-10)	0,25 [0,98] (2-10)	–

(Continuação)

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)			Velocidade de produção linear [R ²] (intervalo usado em dias)				
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM g/(L.d)	EPS g/(L.d)	IPS g/(L.d)	AG mg/(L.d)
(TANG; ZHONG, 2003)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas agitação de 200 rpm, 3,5 L-ar/min (k _L a = 96,0 h ⁻¹). Inóculo*	13,9 (14)	0,92 (13)	2,09 (10)	450 (10)	—	—	—	53 [0,99] (2-10)
(LEE; LEE, 1999)	Glc 60; KH ₂ PO ₄ , 0,5; EL 6; (NH ₄) ₂ HPO ₄ 5; antiespumante Sigma 289 0,5%	2 L em 3 L biorreator tipo “air-lift”; 25 °C; 2,5 vvm.; pH inicial 6,0 (não controlado). Inóculo 5% (v/v)	7,9 (d.8)	4,1** (8)	—	—	1,0 [0,96] (1-7)	0,6 [1,00] (1-7)	—	—
(LEE; LEE, 1999)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas pH controlado em 3,0. Inóculo 5% (v/v)	12,9 (6)	6,4** (8);	—	—	2,4 [1,00] (1-6)	0,7 [0,96] (1-8)	—	—
(LEE; LEE, 1999)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas pH controlado em 6,0. Inóculo 5% (v/v)	5,7 (4)	13,6** (7);	—	—	1,7 [0,99] (1-4)	2,2 [0,99] (1-8)	—	—
(LEE; LEE, 1999)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas controle de pH em dois estágios: 3,0 inicialmente e 6,0 posteriormente. Inóculo 5% (v/v)	8,2 (5)	20,0** (6)	—	—	1,7 [0,99] (1-5)	4,2 [1,00] (2-6)	—	—
(KIM et al., 2002)	Glc 20; EL 2; P 2; K ₂ HPO ₄ 1; KH ₂ PO ₄ 0,46; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5	3 L em biorreator de 5 L; pH inicial 5,0; 25 °C; 150 rpm; 2 vvm. Inóculo 4% (v/v)	6,9 (15)	1,16** (15)	—	—	—	—	—	—
(KIM et al., 2002)	Glc 10; EM 3; P 5; EL 3	Conforme item anterior. Inóculo 4% (v/v)	5,7 (15)	0,66** (10)	—	—	—	—	—	—
(KIM et al., 2002)	CBD 24; EM 10; P 1	Conforme item anterior. Inóculo 4% (v/v)	16,3 (11)	6,5** (12)	—	—	1,52 [0,95] (1-11)	0,60 [0,98] (1-12)	—	—

(Conclusão)

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE CULTIVO REALIZADOS COM *Ganoderma* E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Fonte	Meio, componentes em g/L a menos que especificado	Volume de trabalho, biorreator e condições. Inóculo (densidade da cultura do inóculo)	Concentração máxima obtida (dia)				Velocidade de produção linear (intervalo usado em dias)				[R ²]
			BM (g/L)	EPS (g/L)	IPS (g/L)	AG (mg/L)	BM (g/L.d)	EPS (g/L.d)	IPS (g/L.d)	AG (mg/L.d)	
(SONE et al., 1985)	Glc 50; EM 40; EL 1; KH ₂ PO ₄ 0,5; K ₂ HPO ₄ 0,5; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5	Volume de trabalho*. Cultura agitada a 28 °C. Inóculo*	–	0,85**	–	–	–	–	–	–	–
				(7)							
(HABIJA NIC et al. 2001)	3 kg de batatas descascadas autoclavadas e volume elevado a 10 L com água; Glc 20 g/L; óleo de oliva 2% (v/v)	Volume de trabalho*. Biorreator de 10 L, 3 agitadores Rushton; 300 rpm; pH inicial 5,8; 30 °C; pO ₂ 70-80%; potencial redox 100-450 mV; 30 L-ar/min. Inóculo 17% (massa úmida de BM de uma cultura de 6-dias em frasco agitado).	5,4 (8)	–	–	–	0,9 [0,99] (1-5)	–	–	–	–
(HABIJA NIC et al., 2001)	Conforme item anterior	Conforme item anterior mas após 8 dias 7 L de meio foram substituídos com meio fresco esterilizado. Inóculo conforme item anterior	9,6 (15)	–	–	–	1,1 [0,95] (10-14)	–	–	–	–
(ZHANG et al., 1994)	Glc 30; P 3; K ₂ HPO ₄ 1,5; MgSO ₄ 0,7; vit. B ₁ 0,01	Volume de trabalho*, tanque de 20 ton; 26±1 °C; 7-10 dias. Inóculo*	25 kg total	–	–	–	–	–	–	–	–

*não foi possível determinar do artigo; ** determinado somente por método gravimétrico; *** o fungo usado foi *Ganoderma tsugae*. Meio A = Glc 50; K₂HPO₄ 0,5; KH₂PO₄ 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; EL 1; NH₄Cl 4; Meio B = KH₂PO₄ H₂O 1; MgSO₄.7H₂O 0,5; vitamina B₁ 0,05. Inóculo de disco = vários discos de micélio com ágar de 5 mm x 5 mm. Abreviaturas: d. = dia; BM = massa seca de biomassa; r = velocidade linear de crescimento/produção; EPS = exopolissacarídeo; AG = ácido ganodérico; IPS = intrapolissacarídeo; Glc = glucose; vvm = volumes de ar por volume de trabalho por minuto; TOD = tensão de oxigênio dissolvido; P = peptona; EM = extrato de malte; CBD = caldo batata dextrose; EL = extrato de levedura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

As pesquisas em cultivo com *G. lucidum* visam o desenvolvimento e a aplicação de processos tecnológicos em biorreatores de grande escala para que a produção de polissacarídeos, ácidos ganodéricos e micélio seja comercialmente vantajosa. Entretanto, há muito a ser estudado para que este objetivo seja alcançado e seria impossível abordar em uma dissertação todos os tópicos citados no item 2.6.

Desta forma, o objetivo geral desta dissertação é aumentar o conhecimento sobre o comportamento do fungo *G. lucidum* cultivado em meio submerso em frascos de erlenmeyer apresentando aspectos morfológicos e fisiológicos que poderão, no futuro, servir como ferramenta para a manipulação deste microrganismo em biorreatores de grande escala.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta dissertação podem ser distribuídos dentro de dois grupos: estudos no inóculo e estudos no cultivo principal.

3.2.1 Estudos no Inóculo

O inóculo, apesar de ser uma etapa importante do processo, recebe pouca ou nenhuma atenção dos pesquisadores. Este trabalho tem como parte de seu objetivo mostrar as alterações morfológicas que ocorrem durante esta etapa e busca relacioná-las com a produção de exopolissacarídeos e o consumo de glucose. Para tanto são avaliados o efeito da alimentação de uma quantidade extra de peptona e extrato de levedura durante o processo e o efeito da presença e ausência de glucose no meio de cultivo.

3.2.2 Estudos no Cultivo Principal

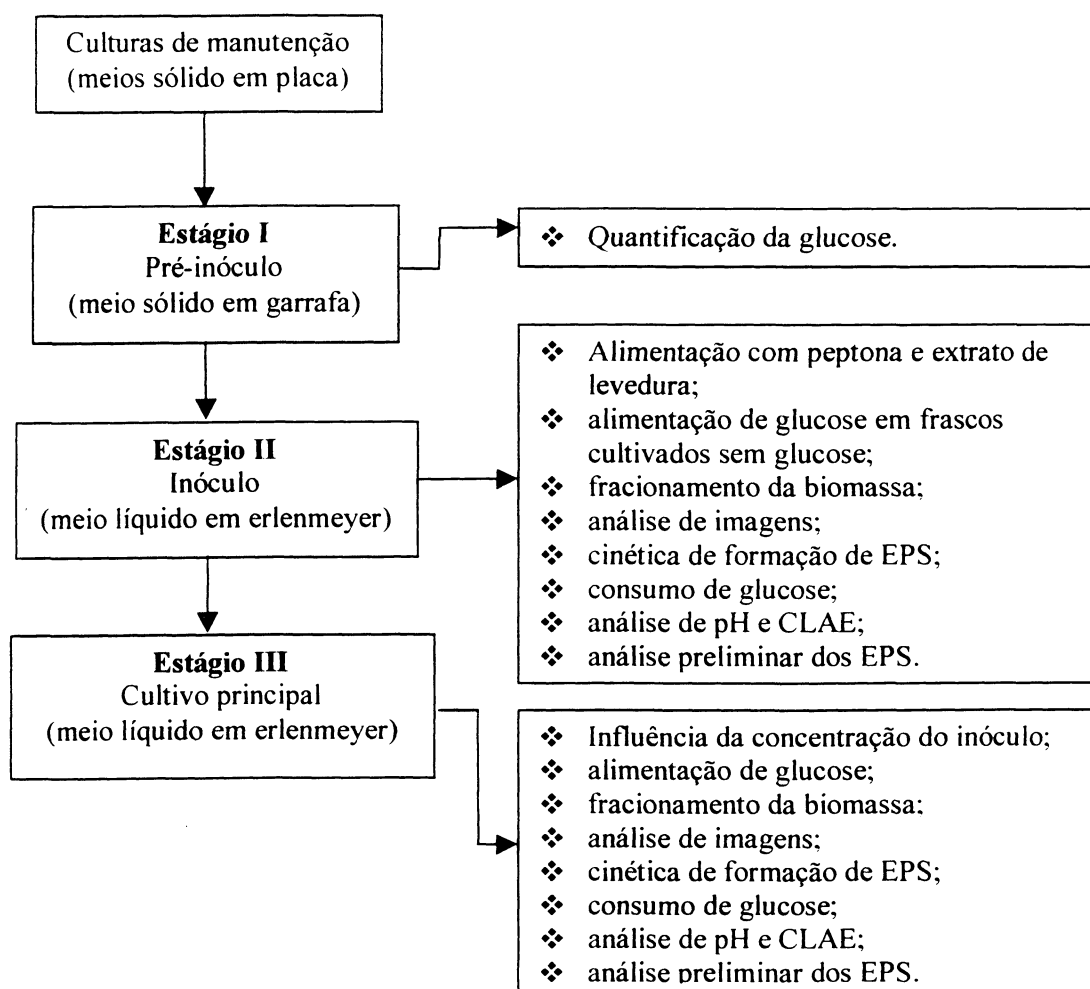
Os objetivos dos estudos realizados nesta fase são: mostrar as alterações morfológicas que ocorrem durante o processo principal, avaliar o efeito da concentração do inóculo e avaliar o efeito da alimentação de uma quantidade extra de glucose na formação de biomassa e produção de exopolissacarídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESQUEMA GERAL DE CULTIVO E DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Ao longo desta dissertação serão relatados os estudos realizados com o fungo *Ganoderma lucidum* em diferentes estágios de um processo de cultivo. A figura 1 mostra estes estágios em forma de fluxograma e permite visualizar de forma rápida quais os estudos realizados em cada estágio.

FIGURA 1 - ESTÁGIOS DO CULTIVO E DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS



4.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA

O microrganismo utilizado foi *Ganoderma lucidum* CMB 0246: linhagem incorporada à Coleção de Culturas da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, gentilmente cedida pelo Centro de Serviços Internacionais para Biotecnologia de Cogumelos da Universidade Chinesa de Hong Kong (Centre for International Services to Mushroom Biotechnology - CISMB / The Chinese University of Hong Kong). As culturas foram mantida em placas de Petri em meio batata dextrose ágar (BDA). As culturas eram incubadas a 29 °C por 10-12 dias no escuro e então armazenadas a 4 °C. A cada 2 meses fazia-se o repique do microrganismo em novas placas.

4.3 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO I)

Uma garrafa de Roux de 1 L contendo 80 mL de meio BDA solidificado era inoculada com aproximadamente 10 discos de micélio em ágar de 5 mm de diâmetro, retirados das culturas de manutenção. Para o corte e retirada destes discos utilizava-se um tubo de aço inoxidável, em forma de “L” com ponta afiada. Os discos eram espalhados na superfície do BDA de forma a proporcionar uma ampla área de cobertura de micélio após o seu crescimento. Várias garrafas eram incubadas por 8 dias a 29 °C no escuro.

4.4 PREPARO DO INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO II)

Para obtenção do inóculo ou cultura no estágio II utilizou-se duas garrafas de Roux cultivadas previamente (culturas no estágio I). Adicionou-se 100 mL de água destilada a cada garrafa e o micélio foi raspado da superfície do meio sólido usando uma lâmina de estilete adaptada à ponta de um bastão de vidro. As suspensões de micélio obtidas foram filtradas através de uma tela de aço inoxidável esterilizada com poros de 700 µm de diâmetro e coletadas em um frasco de erlenmeyer de 250 mL.

O estágio II do cultivo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL com um volume de trabalho de 100 mL de meio composto de (em g/L): glucose (Labsynth) 35,0; peptona (Biobrás) 5,0; extrato de levedura (Biobrás) 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Labsynth) 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth) 0,5; cloridrato de tiamina (Nuclear) 0,05. Este meio é uma adaptação do utilizado por FANG e ZHONG (2002a), que utilizaram $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ao invés do sal de sódio. Após preparado o meio, fazia-se a correção do pH para 5,0 com adição de HCl concentrado. Para a esterilização cada erlenmeyer foi preenchido com 85 mL de meio sem glucose a qual foi dissolvida separadamente e dividida em tubos, cada um contendo 10 mL de solução. Tanto os tubos como os erlenmeyers eram esterilizados a 121 °C por 15 min em autoclave e então o conteúdo de um tubo era adicionado a um erlenmeyer. Após atingida a temperatura ambiente os frascos eram inoculados com 5 mL da suspensão de micélio, a qual era constantemente agitada. Os frascos foram a 29 °C no escuro, a 128 rpm em agitador orbital, por períodos que variaram de 16 a 25 dias dependendo do experimento.

4.5 AMOSTRAGEM

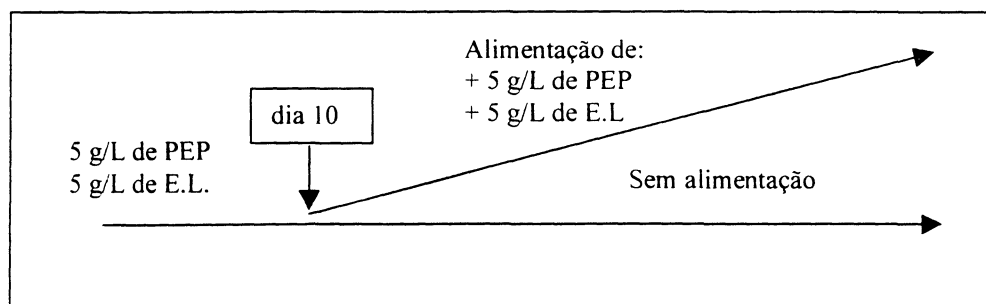
Na maioria dos experimentos três frascos foram coletados a cada amostragem em intervalos que variaram de 2 a 4 dias, dependendo do experimento. Em alguns experimentos foram coletados dois frascos a cada amostragem. Nestes casos esta informação será dada durante a descrição do experimento. Os resultados são, portanto, apresentados como média das duplicatas ou triplicatas $\pm$ erro padrão.

4.6 ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA EM CULTURAS NO ESTÁGIO II

A alimentação de fontes complexas de carbono e nitrogênio foi feita após 13 dias de cultivo. 10 mL de uma solução de peptona e extrato de levedura foram adicionados a cada erlenmeyer aumentando a concentração de cada um destes componentes em 5,0 g/L. O volume de trabalho após a alimentação passou a ser de

110 mL. Em paralelo foi mantido um grupo de frascos não alimentados que serviu como controle do experimento. O tempo total de cultivo foi de 25 dias. Um esquema deste experimento pode ser visto na figura 2.

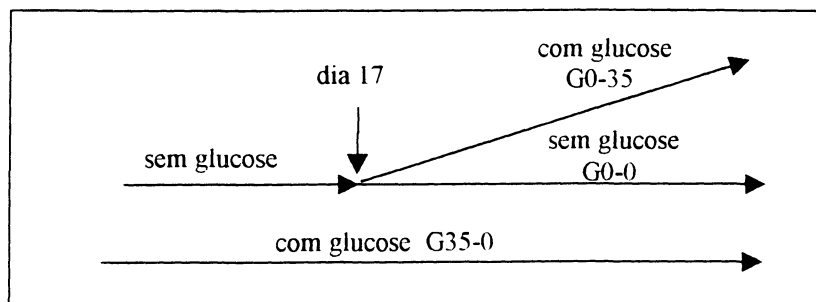
FIGURA 2 – ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA



4.7 ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II INICIALMENTE CULTIVADAS NA AUSÊNCIA DE GLUCOSE

Para observar os efeitos da glucose na morfologia e fisiologia de *G. lucidum*, 5 mL de uma suspensão de micélio da cultura no estágio I foram inoculados em 22 frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 95 mL de meio sem glucose. Após 17 dias de cultivo, 10 mL de uma solução de glucose foram adicionados a 8 destes frascos proporcionando uma concentração de glucose de 35 g/L e um volume de trabalho de 110 mL. Estas culturas foram denominadas G0-35. Os frascos restantes, que não receberam a solução de glucose, continuaram com um volume de trabalho de 100 mL e serviram como controle negativo (ausência de glucose). Estas culturas foram denominadas G0-0. Em paralelo, outro grupo de frascos contendo glucose 35 g/L desde o início foi mantido como controle positivo (presença de glucose). Estas culturas foram denominadas G35-0. O tempo total de cultivo foi de 25 dias. Um esquema deste experimento pode ser visto na figura 3. A amostragem deste experimento foi realizada em duplicata.

FIGURA 3 – ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE EM CULTURAS CULTIVADAS INICIALMENTE SEM GLUCOSE



4.8 CULTIVO PRINCIPAL (CULTURAS NO ESTÁGIO III)

O mesmo meio, tipo de frasco e volume de trabalho usados para o preparo do inóculo (culturas no estágio II) foram usados para o cultivo principal. As únicas diferenças foram a forma de inóculo e o tempo total de cultivo, que variou de 13 a 19 dias, dependendo do experimento. No caso do cultivo principal o inóculo consistiu de uma alíquota diluída (nos estudos preliminares) ou concentrada (nos experimentos subseqüentes), de uma cultura no estágio II após 16 dias de cultivo. Em uma cultura com esta idade os *pellets* já haviam se fragmentado, tornando possível a retirada de alíquotas contendo aproximadamente a mesma quantidade de biomassa. O inóculo foi introduzido nas culturas com uma pipeta de 5 mL contendo uma ponteira que teve a ponta cortada a 2 cm da sua extremidade distal, deixando-a com um orifício de 5 mm de diâmetro.

4.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO NA CULTIVO PRINCIPAL (ESTÁGIO III)

Para avaliar o efeito da concentração do inóculo na formação de biomassa e produção de EPS durante o cultivo principal, realizou-se um experimento inoculando um grupo de frascos com 10 mL de uma cultura no estágio II, sem ter sido diluída. Estas culturas foram chamadas de cultura A. Um outro grupo de frascos foi inoculado com 5 mL da mesma cultura após ter sido diluída 1,5 vezes com água destilada (50 mL de água adicionados a 100 mL de cultura). As culturas inoculadas com este inóculo

diluído foram denominadas culturas B. As diferentes concentrações e quantidade de inóculo usadas proporcionaram uma concentração inicial de biomassa inoculada, em termos de massa seca, de 594 ± 4 mg/L e 137 ± 15 mg/L nas culturas A e B, respectivamente. O volume de trabalho foi 100 mL em ambas as culturas e apesar de o volume de inóculo ter sido diferente nas culturas A e B, a concentração final de nutrientes foi devidamente calculada para ser a mesma nas duas culturas.

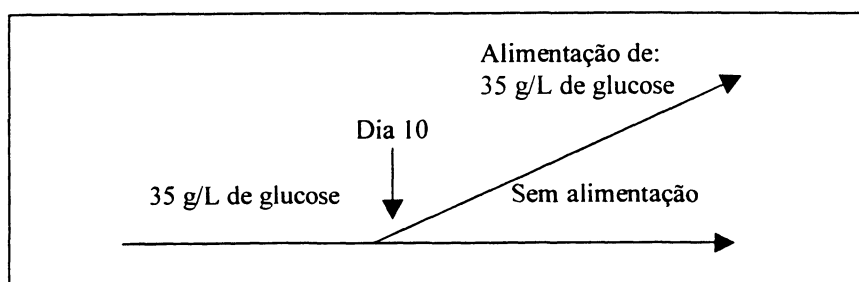
O tempo total de cultivo foi de 19 dias e a amostragem deste experimento foi realizada em duplicata.

4.10 EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NO CULTIVO PRINCIPAL (ESTÁGIO III)

Com o objetivo de aumentar a produção de biomassa e exopolissacarídeos adicionou-se uma quantidade extra de glucose após 10 dias de cultivo, aumentando a concentração deste açúcar no meio em 35 g/L. Para tanto 10 mL de uma solução de glucose, previamente esterilizada, foram adicionados a cada frasco de erlenmeyer aumentando o volume de trabalho para 110 mL. Um esquema do experimento pode ser visto na figura 4.

O tempo total de cultivo foi de 19 dias e a amostragem deste experimento foi realizada em duplicata.

FIGURA 4 - ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE EM CULTURAS NO ESTÁGIO III.



4.11 FRACIONAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Como realizado por FANG e ZHONG (2002b, 2002c), a biomassa foi fracionada de acordo com o tamanho dos *pellets* usando tamises de diferentes malhas. A malha dos tamises utilizados por estes autores foi de 1,2 mm e 1,6 mm de diâmetro, já as malhas dos tamises empregados neste trabalho foram de 2,0 e 0,8 mm de diâmetro. Desta forma as frações obtidas foram denominadas: G (grande) para os *pellets* maiores que 2,0 mm de diâmetro, M (media) para os *pellets* entre 2,0 mm e 0,8 mm de diâmetro e P (pequena) para os *pellets* menores que 0,8 mm de diâmetro. Além de separar o micélio submerso em três frações, como fizeram FANG e ZHONG, separou-se uma quarta fração denominada fração A que representa o micélio que cresceu aderido à parede interna do frasco. Cada fração foi retirada do tamis lavando-a com água destilada e recolhendo-a em um recipiente de plástico. A biomassa foi separada por filtração sob pressão reduzida em papel de filtro qualitativo. Na sequência, a biomassa foi removida deste papel de filtro com espátula e pinça e seca a 70 °C até massa constante sobre uma placa de Petri pré-pesada.

4.12 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

O meio de cultivo mais a água utilizada para lavar a biomassa dos tamises foi concentrado a aproximadamente 50 mL, por evaporação a 60-80 °C sob pressão reduzida. Esta solução foi adicionada a 3 volumes de uma solução de etanol a 96°. O precipitado na forma de fibras recuperado por enrolamento destas fibras em um bastão de vidro foi denominado PB (precipitado bastão). A solução turva restante era deixada em repouso por aproximadamente 12 h a 4 °C e o precipitado denominado PC (precipitado centrífuga) era obtido por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Ambos os precipitados eram lavados com aproximadamente 100 ml de etanol a 96°, ressuspendidos em água destilada, congelados, liofilizados e pesados.

Alíquotas de todas as amostras de precipitado PC e PB utilizadas para se determinar o conteúdo de carboidratos presentes nestes precipitados. Para tanto

utilizou-se o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) usando a D-glucose (DiaSys Diagnostic Systems GMBH&Co.KG) como padrão em concentrações de 10 a 100 µg/mL. Denominou-se EPS (exopolissacarídeo) apenas a conteúdo total de carboidrato presente no precipitado PB. O conteúdo total de carboidrato presente no precipitado PC não foi chamado de EPS uma vez que este precipitado é originado principalmente da peptona e do extrato de levedura.

4.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE

Uma alíquota de 0,5 mL do meio de cultivo centrifugado a 2.500 rpm era retirada antes do fracionamento da biomassa e armazenada a -18 °C até o final do experimento quando, então, a concentração de glucose foi determinada pelo método enzimático da glucose oxidase (DiaSys Diagnostic Systems GMBH&Co.KG) (DAHLQVIST, 1961). As amostras foram diluídas de 10 a 100 vezes para se obter concentrações que estivessem dentro da faixa de sensibilidade do método. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (700 Plus, Femto) em 500 nm, conforme instrução do fabricante do kit de reagente.

4.14 ANÁLISE DE pH E CLAE

O pH da amostra foi determinado potenciometricamente antes de se fracionar a biomassa. Para tanto utilizou-se pHmetro digital (PG1000, Gehaka).

Com o objetivo de se identificar a produção de ácidos analisou-se as amostras do meio de cultivo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras de 0,5 mL obtidas conforme descrito no item anterior foram diluídas com água destilada (fator de diluição 1:4), colocadas em tubos de Eppendorf fechados e submetidas a tratamento térmico por 10 min a 95 °C em banho-maria. Na seqüência as amostras foram agitadas e centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm. O equipamento utilizado para as análises foi um sistema Shimadzu, modelo LC10AD, provido de mostrador automático SIL10A e sistemas de detecção por espectrometria de absorção

no ultravioleta a 205 nm (SPD – 10A, Shimadzu) e por índice de refração (RID10A, Shimadzu). As análises foram realizadas a 65 °C em uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), com fase móvel H₂SO₄ 8 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. Os ácidos utilizados como padrão foram: acético, butanóico, cítrico, fórmico, fumárico, láctico, maléico, oxálico, propiônico e valérico.

4.15 DETERMINAÇÃO DA GLUCOSE EM MEIO SÓLIDO

Para verificar se o fungo durante o estágio I crescia na presença de glucose analisou-se a concentração deste açúcar no BDA após 10 dias de cultivo nas condições descritas na seção 4.3.

Retirou-se uma lâmina de 1,0 x 1,0 x 0,06 cm e outra de 1,0 x 1,0 x 0,11 cm (comprimento x largura x espessura) de BDA com micélio na superfície. Esta lâmina de micélio com meio foi imersa em água destilada por 1 h, sendo em seguida macerada com bastão de vidro e o volume da solução elevado a 10 mL em uma proveta deste volume. A concentração de glucose nesta solução foi determinada pelo método da glucose oxidase (DAHLQVIST, 1961) e o valor corrigido para o volume da lâmina de BDA.

4.16 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Amostras de EPS, obtidas das culturas no estágio II e III foram submetidas a hidrólise total com TFA 1 M por 8 horas a 100 °C. Os alditois acetato referentes aos monossacarídeos obtidos com a hidrólise foram preparados conforme WOLFROM e THOMPSON (1963). A identificação dos alditois acetato foi realizada por CG-EM (Saturn 2000R- Varian) comparando-se seus respectivos valores de R_f e seus perfis de IE-EM com padrões de alditois acetato (Sigma Co.), utilizando uma coluna capilar (DB-225 30 m x 0.25 mm d.i.), He como gás de arraste (fluxo 1,5 mL/min), apresentando a seguinte programação da rampa de temperatura: 50 °C por um minuto e elevação da temperatura até 220 °C (40 °C/min) mantida isotermicamente até o final da

corrida (25 min). A quantificação dos alditois acetato foi realizada por integração da área sob a curva de eluição.

As amostras submetidas à análise foram obtidas de diferentes formas de cultivo, conforme descrito na tabela 2. Todas as frações de EPS foram obtidas como descrito na seção 4.12 exceto a amostra GLII-SL, que foi obtida a partir da filtração do meio de cultivo sem a lavagem do micélio com água destilada.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE EPS SUBMETIDAS A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Amostra	Forma de cultivo	Dia de coleta do EPS
GLII-SL	Estágio II. Com 35 g/L de glucose no início do cultivo. EPS recolhido sem lavagem (SL) do micélio.	15
GLII-NR	Estágio II. Com 35 g/L de glucose no início do cultivo. EPS recolhido após lavagem do micélio. Tratamento normal (NR).	17
GLII-AL	Estágio II. Sem glucose no início do cultivo. Alimentação (AL) de 35 g/L de glucose no 17º dia. EPS recolhido após lavagem do micélio.	25
GLIII-NR	Estágio III. Com 35 g/L de glucose no início do cultivo. EPS recolhido após lavagem do micélio. Tratamento normal (NR).	7
GLIII-AL	Estágio III. Com 35 g/L de glucose no início do cultivo. Alimentação (AL) de 35 g/L de glucose no 10º dia. EPS recolhido após lavagem do micélio.	13

4.17 ANÁLISE DE EPS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 MHz e a amostra foi preparada de acordo com a sua solubilidade. 30 mg de EPS (amostra GLII-SL), foram dissolvidas em DMSO deuterado a 70 °C. e o seu espectro de RMN foi realizado em tubos de quartzo de 20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos foram medidos em p.p.m. utilizando TMS-tetra-metil-silano ($\delta = 0$) como referência. O experimento de RMN de ^{13}C foi realizado com o carbono desacoplado e obtido em 100.625 MHz com relação ao núcleo de ^{13}C .

4.18 ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO MEIO DE CULTIVO

A identidade e quantidade dos carboidratos presentes no meio de cultivo, na forma de monossacarídeos ou associados a outras moléculas na forma de di, tri ou oligossacarídeos, foi determinada conforme descrito nos próximos parágrafos.

1 mL do meio de cultivo (peptona e extrato de levedura, sem glucose) foi adicionado a três volumes de etanol para precipitação de proteínas e polissacarídeos que foram removidos por centrifugação.

Para se identificar os monossacarídeos tanto na forma livre como aqueles constituintes de moléculas pequenas como di, tri e oligossacarídeos, submeteu-se o sobrenadante à hidrólise total com TFA 1 M por 8 h a 100 °C e ao preparo e análise dos alditóis acetato conforme descrito na seção 4,16. Esta amostra foi denominada PEL –HT (Peptona e Extrato de Levedura – Hidrólise Total)

Para se identificar somente os monossacarídeos livres presentes no meio, submeteu-se o sobrenadante, obtido a partir da precipitação do meio com etanol, ao preparo dos alditóis acetato, sem submeter a amostra à hidrólise total. Esta amostra foi denominada PEL-ML (Peptona e Extrato de Levedura – Monossacarídeos Livres).

A quantificação dos alditóis acetato foi realizada por integração da área sob a curva de eluição. Para ambas as amostras utilizou-se como padrão interno 0,5 µL de acetato de octila a 0,1 mg/mL.

4.19 FOTOGRAFIAS

A morfologia do micélio foi observada e fotografada em microscópio óptico (Zeiss Axiophot) e lupa (Zeiss Stemi 2000-C). Para análise na lupa os *pellets* e fragmentos de *pellets* estavam ou submersos no meio de cultivo ou em água destilada pois desta forma a visualização da região periférica dos *pellets* era facilitada.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados em três seções, sendo as duas primeiras divididas de acordo com o estágio do processo no qual os experimentos foram realizados: inóculo (culturas no estágio II) e cultivo principal (cultura no estágio III). A terceira seção trata das análises preliminares dos exopolissacarídeos produzidos nos dois estágios do processo e da análise dos carboidratos presentes no meio de cultura.

5.1 ESTUDOS NO INÓCULO (CULTURAS NO ESTÁGIO II)

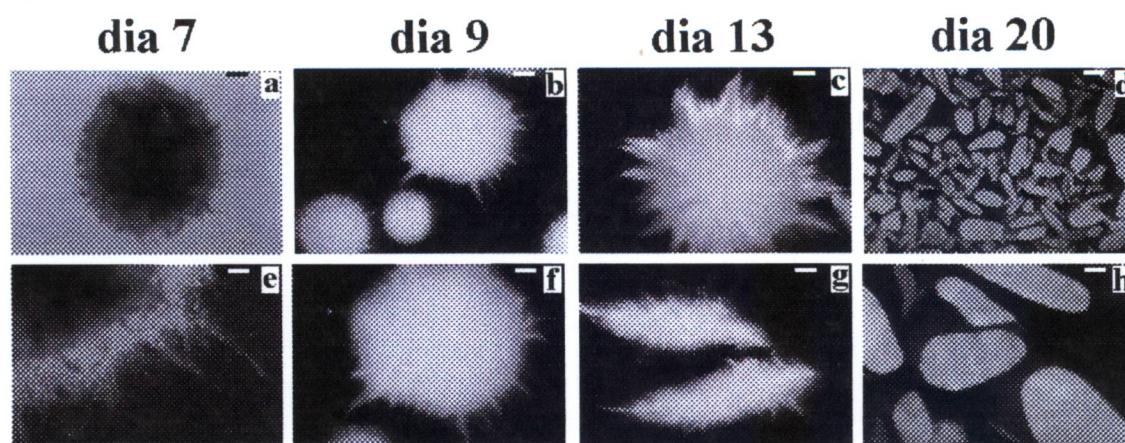
Como descrito anteriormente, as culturas no estágio II são classificadas desta forma por serem inoculadas com uma suspensão de micélio cultivado em meio sólido em garrafas de Roux (ver seção 4.4).

5.1.1 Observações Preliminares do Crescimento, Morfologia e Fisiologia

A tabela 1, apresentada no Capítulo 2, mostra uma série de meios de cultivo empregados para *G. lucidum*. Inicialmente procurou-se utilizar um meio que não fosse composto por uma grande quantidade de substâncias indefinidas e que poderiam precipitar juntamente com os exopolissacarídeos durante o processo de extração com etanol. Desta forma testou-se, qualitativamente, o meio utilizado por YANG e LIAU (1998a) que contém apenas 1,0 g/L de extrato de levedura, complementado por sais. Os resultados não foram satisfatórios visto que a quantidade de biomassa obtida foi muito pequena. Como segunda opção, testou-se o meio utilizado por FANG e ZHONG (2002a) que apesar de ser composto por uma quantidade maior de fontes complexas de carbono e nitrogênio, era bastante empregado na literatura e, de acordo com esta, proporcionava um bom rendimento de biomassa. Os resultados obtidos nestes testes iniciais de crescimento confirmam a informação de que *G. lucidum* prefere utilizar fontes orgânicas do que fontes inorgânicas de nitrogênio (FANG, ZHONG; 2002b).

As alterações morfológicas ocorridas durante o cultivo são apresentadas na figura 5. As fotos mostradas representam a morfologia predominante no dia indicado, entretanto alguns elementos com morfologia de uma fase anterior ou posterior podem ser encontrados, em uma menor proporção, em um mesmo dia. No 7º dia os *pellets* eram basicamente esferas (figura 5a) com algumas hifas longas na sua superfície (figura 5e). Após 2 dias o diâmetro do *pellet* aumentou e aquelas hifas longas observadas na superfície originaram protuberâncias (figuras 5b e 5f) que cresceram em comprimento e largura (figura 5c). Após 13 dias de cultivo estas protuberâncias começaram a se soltar dos *pellets* (figura 5g), que ao serem seccionados transversalmente mostraram a presença de um centro oco (imagem não mostrada). No 15º dia de cultivo os *pellets* se desmancharam completamente (imagem não mostrada). As protuberâncias liberadas serão chamadas de “*pellets* de segunda geração”. Estes *pellets* de segunda geração cresceram em número e tamanho e 20 dias após a inoculação (figuras 5d e 5h) eles apresentavam-se com um tamanho muito menor que os *pellets* de primeira geração e com um formato alongado semelhante a um grão de arroz.

FIGURA 5 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS *PELLETS* EM CULTIVO SUBMERSO NO ESTÁGIO II



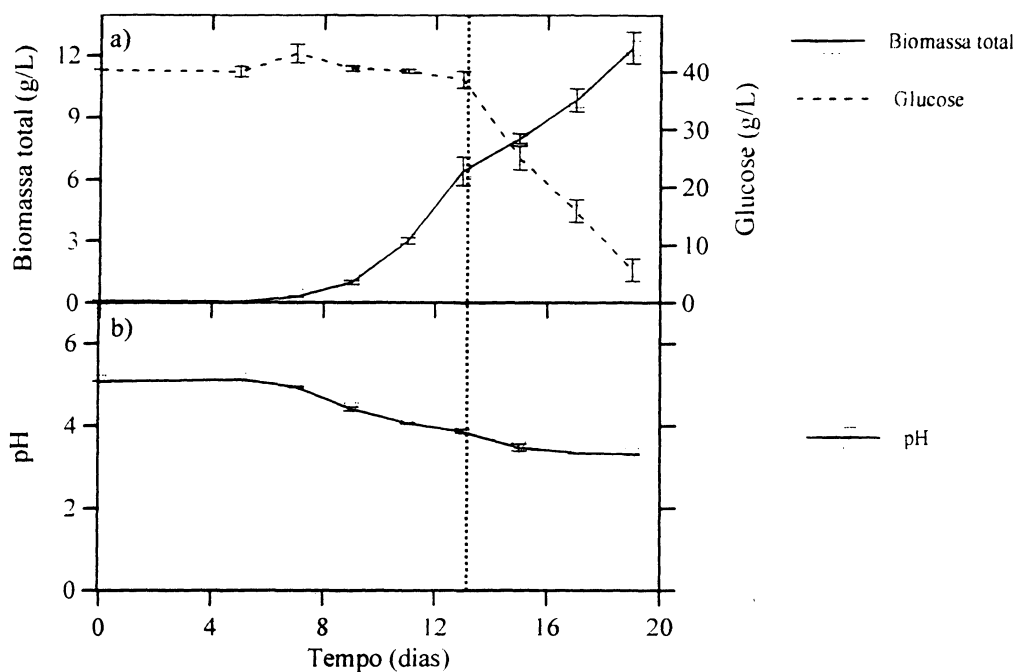
Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B₁ 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 20 dias. Escala: a) 0,25 mm; b) 1,5 mm; c) 1,5 mm; d) 1,5 mm; e) 0,1 mm; f) 1,0 mm; g) 0,8 mm; h) 0,3 mm.

A figura 6a mostra o perfil de crescimento e consumo de glucose por *G. lucidum* durante 19 dias de cultivo no estágio II do processo. A concentração de glucose que inicialmente era de aproximadamente 40 g/L permaneceu constante até o 13º dia, quando só então começou a diminuir. Neste dia, a concentração de biomassa obtida foi de $6,4 \pm 0,7$ g/L, valor este que representa aproximadamente a metade da concentração total de biomassa obtida no final do cultivo. Para produzir esta concentração da biomassa sem consumir a glucose, o microrganismo deve ter consumido a maior parte do extrato de levedura e da peptona. O fator de conversão de substrato em biomassa esperado a partir do consumo destes nutrientes seria algo entre 0,5 g/g (para a glucose consumida aerobicamente) e 1,0 g/g (para a *n*-parafina consumida aerobicamente) (BAILEY; OLLIS, 1986). Supondo que toda a peptona e extrato de levedura (total de 10 g/L) tivessem sido consumidos até o momento de o fungo começar a utilizar a glucose, o fator de conversão de substrato em biomassa seria de 0,64 g-biomassa/g-peptona e extrato de levedura.

No 19º dia a concentração de biomassa foi de $12,4 \pm 0,8$ g/L e a concentração de glucose no meio de cultivo era de $5,7 \pm 1,9$ g/L. Nesta segunda fase, quer dizer entre os dias 13 e 19, o consumo de glucose foi evidente e a biomassa deve ter sido formada quase que exclusivamente a partir deste açúcar, uma vez que os demais fontes de carbono devem ter sido consumidos quase que totalmente durante a fase inicial. O fator de conversão de substrato em biomassa calculado com base na glucose consumida seria de apenas 0,19 g-biomassa/g-glucose.

A variação de pH ao longo do cultivo está mostrada na figura 6b. O pH que inicialmente era de 5,08 diminuiu gradativamente até $3,31 \pm 0,01$ no 19º dia. A produção de ácidos orgânicos foi investigada nos experimentos seguintes.

A desagregação dos *pellets*, anteriormente mostrado na figura 5 é visualizado também na figura 7, que mostra, em termos de massa seca, a distribuição das frações de biomassa com diferentes tamanhos ao longo do tempo.

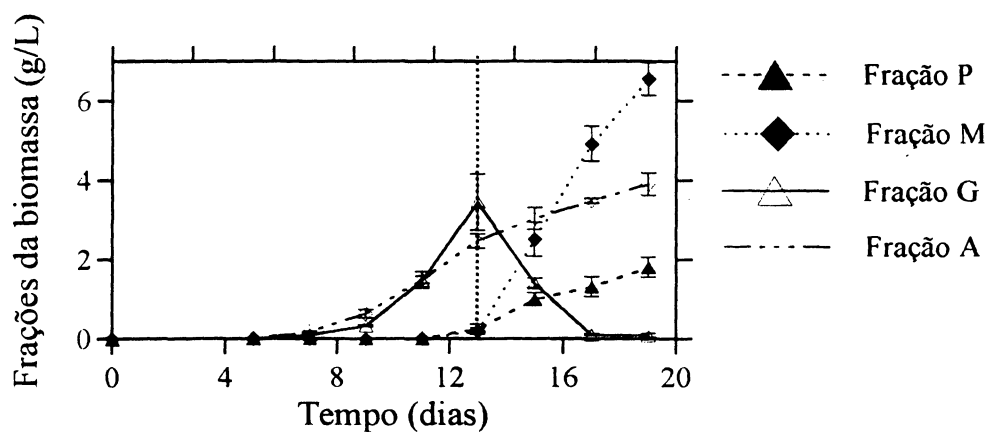
FIGURA 6 – PERFIL DAS CULTURAS NO ESTÁGIO II

a) Curva de crescimento e consumo de glucose. b) variação do pH.

Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 19 dias.

Biomassa inicial $0,088 \pm 0,004$ g/L. Amostragem em triplicata.

FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DA BIOMASSA EM DIFERENTES FRAÇÕES NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II

Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 19 dias.

Biomassa inicial $0,088 \pm 0,004$ g/L. Amostragem em triplicata.

A fração G (maior que 2 mm de diâmetro) aumentou até o 13º dia, e a curva de crescimento desta fração se ajustou bem a equação 1, que representa a lei da raiz cúbica (NIELSEN, 1996).

$$M^{1/3} = k_p t + M_0^{1/3} \quad \text{Equação 1}$$

Nesta equação M representa a massa do *pellet*, M_0 representa a massa do *pellet* no tempo $t = 0$ e k_p é um parâmetro cinético que representa a velocidade de crescimento. Como neste trabalho não se determinou a massa individual de cada *pellet*, utilizou-se a concentração total de *pellets* para representar M e M_0 . Desta forma, o valor de k_p encontrado para este experimento foi de $0,189 \text{ (g L}^{-1}\text{)}^{1/3} \text{ dia}^{-1}$ (com a soma dos desvios quadrados de 0,013).

Após o 13º dia os *pellets* começaram a se desmanchar. Deste momento em diante houve um aumento de biomassa nas frações M (entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro) e P (menor que 0,8 mm de diâmetro). Este aumento das frações M e P aconteceu uma vez que os *pellets* de segunda geração eram menores que 2,0 mm de diâmetro e portanto foram incorporados a estas duas frações. Uma grande quantidade de biomassa aderida (fração A) foi também observada do início até o final do cultivo (figura 7). No 9º dia esta fração representava 65% da biomassa total e apesar de esta fração sempre aumentar em valores absolutos, a sua proporção em relação à biomassa total diminuiu para 32% no 19º dia.

Apesar de o crescimento dos *pellets* ocorrer seguindo a lei da raiz cúbica após a fase *lag*, o crescimento total foi basicamente linear entre os dias 9 e 18, com uma velocidade de crescimento de $1,129 \text{ g/(L.dia)}$ ($R^2 = 0,991$).

O precipitado removido com um bastão (PB), obtido por precipitação com etanol, aumentou ao longo do cultivo como pode ser visto na figura 8a. O conteúdo de carboidrato determinado neste precipitado variou de $55 \pm 3\%$ (m/m), para as amostras retiradas no 7º dia, para $81 \pm 6\%$ para as amostras do 19º dia. O conteúdo total de carboidrato no PB, e que foi denominado EPS, também está mostrado na figura 8a. O valor máximo de EPS obtido neste experimento foi de $597 \pm 81 \text{ mg/L}$ no 19º dia de

cultivo, que corresponde ao dia em que a glucose foi exaurida. A produção de EPS aumentou significativamente após o 13º dia, quando houve a liberação dos *pellets* de segunda geração. Isto pode ser visto mais facilmente na figura 8b que mostra que até o 13º dia a relação EPS/biomassa apresentava queda, mas passou a aumentar após este dia, quando os *pellets* se desmancharam. Este comportamento indica que a desagregação dos *pellets* e o consumo de glucose são importantes para a produção de EPS.

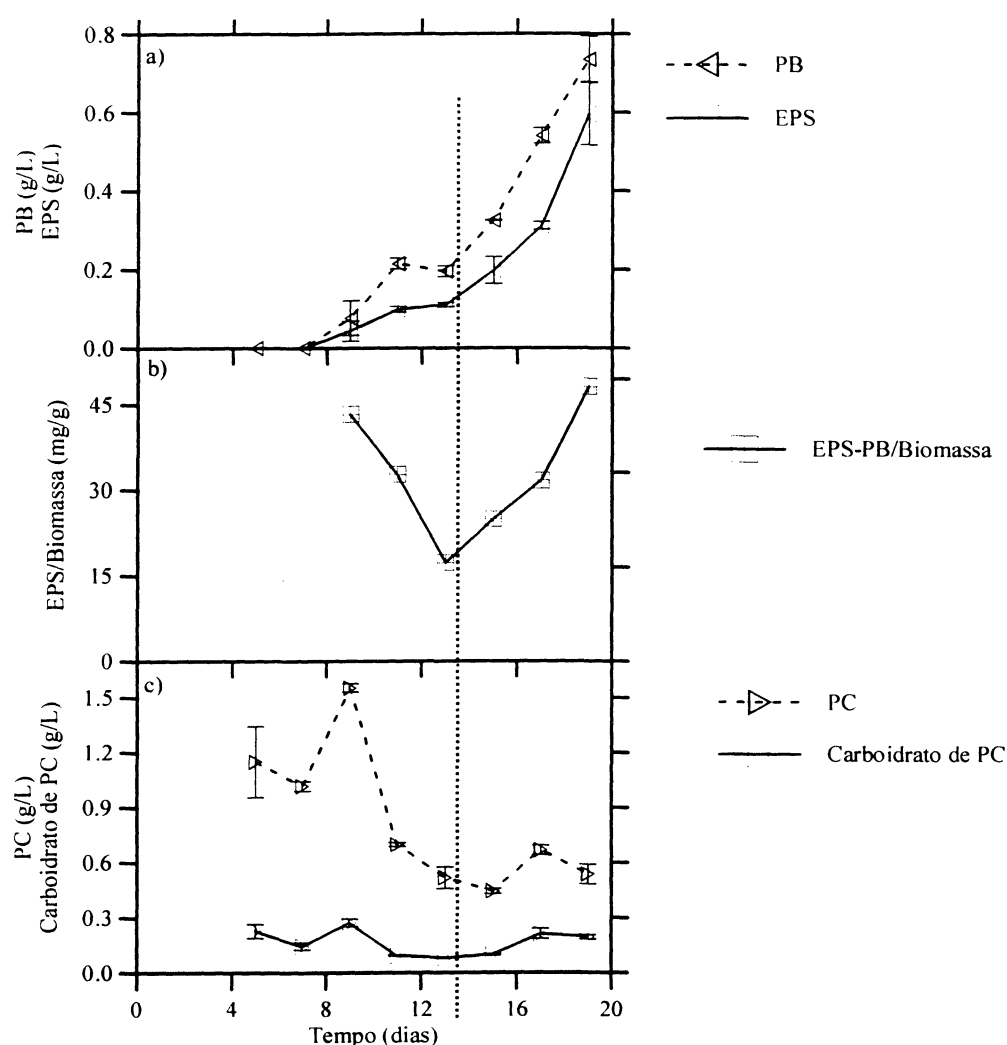


FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II

a) Produção de precipitado PB e EPS ao longo do tempo. b) Relação EPS/Biomassa ao longo do tempo. c) Precipitado PC e carboidratos totais deste precipitado ao longo do tempo.

Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 19 dias. Biomassa inicial $0,088 \pm 0,004$ g/L. Amostragem em triplicata.

O precipitado etanólico obtido por centrifugação (PC) não se mostrou tão interessante como PB. Do início ao final do cultivo ocorreu uma queda na quantidade de PC que era proveniente da peptona e do extrato de levedura presentes no meio. A quantidade de precipitado não variou significativamente após o 13º dia. (figura 8c). Além disso, o conteúdo de carboidrato em PC era bem inferior ao observado em PB variando de $20 \pm 0\%$ (m/m) no início para $36 \pm 2\%$ no final do cultivo. O conteúdo total de carboidratos em PC também está mostrado na figura 8c.

5.1.2 Efeitos da Alimentação de Peptona e Extrato de Levedura

Para verificar se algum componente presente no extrato de levedura ou na peptona estava inibindo o consumo de glucose durante os primeiros dias de cultivo, propôs-se uma alimentação de peptona e extrato de levedura no 13º dia, antes de o fungo começar a utilizar a glucose. Se fosse verdadeira a hipótese de que algum componente do meio estivesse inibindo o consumo da glucose, o aumento da concentração do inibidor, após a sua alimentação, faria com que a inibição se estendesse por um período maior. Da mesma forma, se a liberação dos *pellets* de segunda geração estivesse relacionada com o início do consumo de glucose, então o desenvolvimento morfológico também seria afetado, ou seja, a liberação dos *pellets* de segunda geração seria retardada.

Entretanto, os resultados não confirmaram a hipótese de que algum componente da peptona ou do extrato de levedura estava causando a inibição da utilização da glucose no início do cultivo. A figura 9a mostra os perfis de crescimento e consumo de glucose em culturas alimentadas e não alimentadas (controle). Após 4 dias da alimentação a concentração de biomassa nestas culturas era um pouco maior que nas culturas não alimentadas, entretanto, a concentração máxima de biomassa

obtida após 21 dias de cultivo foi a mesma para ambos os tratamentos, sendo de $12,7 \pm 0,4$ g/L para as culturas alimentadas e $12,8 \pm 0,3$ g/L para as culturas controle.

Ao contrário do que se havia imaginado, a concentração de glucose diminuiu mais rapidamente nas culturas alimentadas do que nas culturas controle (figura 9a) e a fragmentação dos *pellets* foi acelerada com a adição de mais peptona e extrato de levedura. Isto pode ser observado na figura 9b onde está mostrada a quantificação de biomassa na fração G (maior que 2 mm de diâmetro) nas culturas alimentadas e não alimentadas. O aumento de biomassa nesta fração, entre o 13º e o 17º dia, nas culturas não alimentadas, indica que os *pellets* continuavam crescendo em tamanho e que a sua desagregação ainda não era o processo predominante. Por outro lado, a diminuição da fração G nas culturas alimentadas, durante este mesmo período, indica que o processo de desagregação dos *pellets* já era intenso nestas culturas.

A análise das imagens confirma os dados mostrados na figura 9b. Na figura 10 apresenta-se as imagens das culturas não alimentadas e alimentadas no 17º dia de cultivo. As culturas não alimentadas ainda possuíam uma grande quantidade de *pellets* de primeira geração (figura 10a) enquanto nas culturas alimentadas a maioria do micélio já estava na forma de *pellets* de segunda geração (figura 10b).

Da mesma forma que observado para a biomassa, a alimentação de peptona e extrato de levedura não influenciou o máximo de produção de EPS pois em termos de quantidade absoluta não houve diferenças significativas. Os frascos não alimentados, contendo um volume de trabalho de 100 mL, com uma concentração de 705 ± 94 mg/L proporcionaram $70,5 \pm 9,4$ mg de EPS, enquanto os frascos alimentados, contendo um volume de trabalho de 110 mL, com uma concentração de 686 ± 87 mg/L, tinham $75,5 \pm 9,6$ mg de EPS. As razões EPS/biomassa no 21º dia foram iguais, sendo de 5,36 mg-EPS/g-biomassa para a cultura alimentada e 5,55 mg-EPS/g-biomassa para as culturas não alimentadas. Entretanto, na figura 9c pode-se observar que no 17º dia a concentração de EPS era significativamente maior nas culturas alimentadas do que nas culturas não alimentadas. Assim como mostrado na figura 8b, nota-se novamente uma relação entre morfologia e produção de EPS.

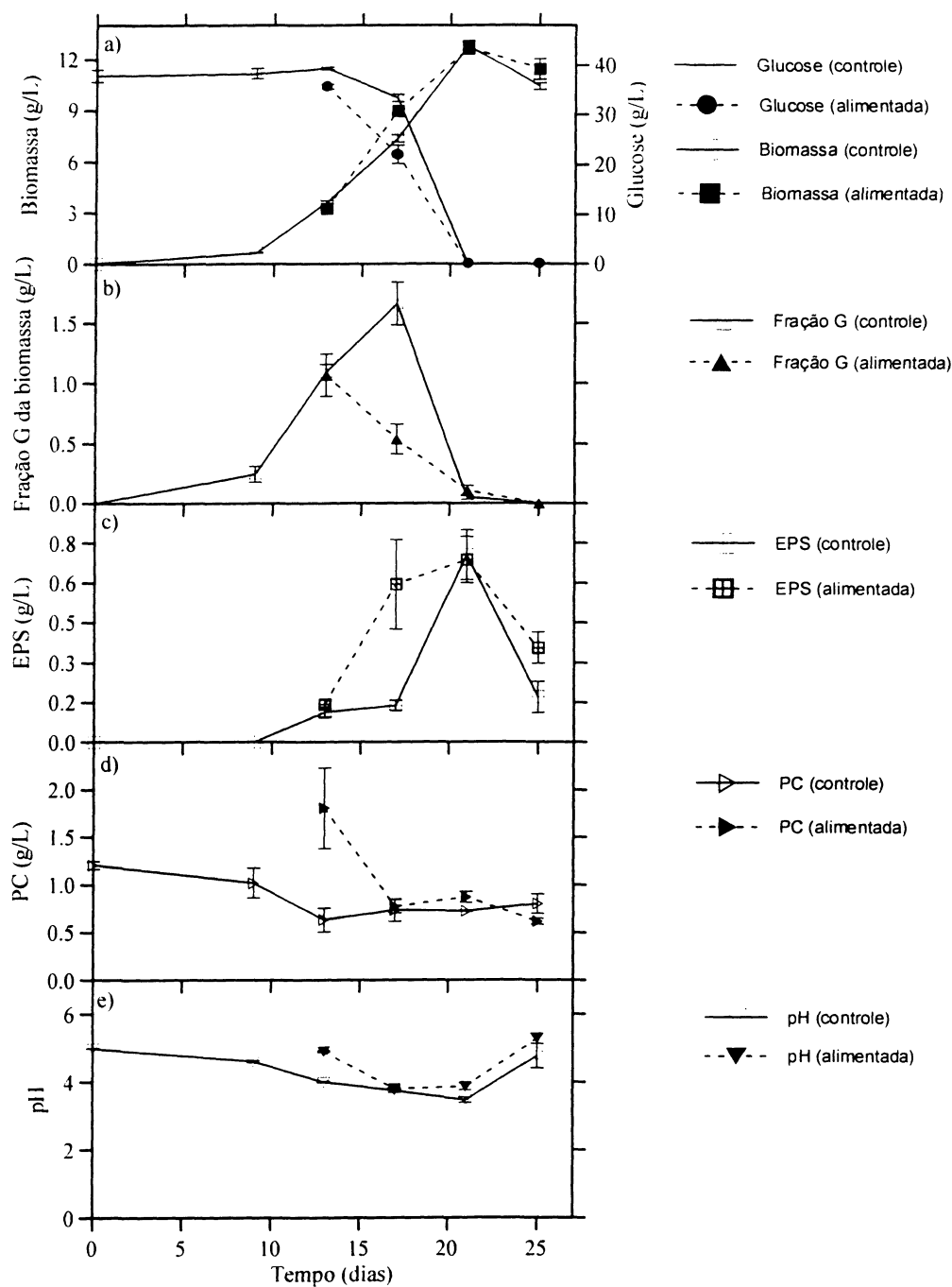
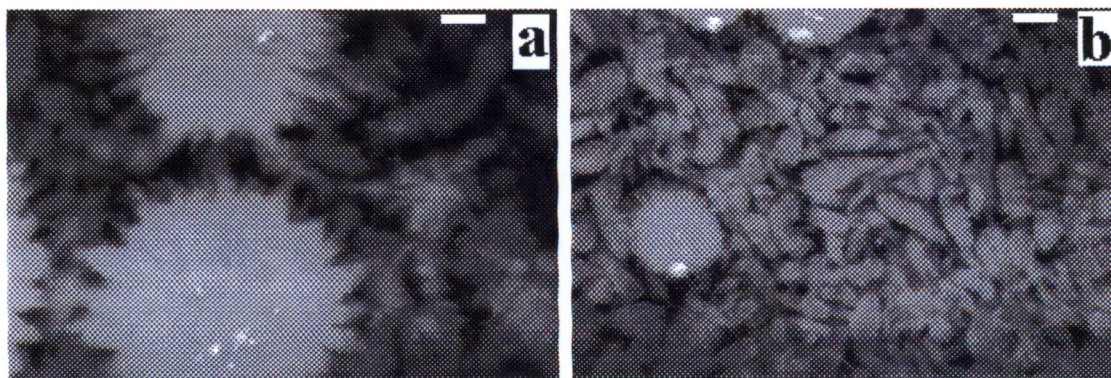


FIGURA 9 – EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA EM CULTURAS NO ESTÁGIO II

a) Curva de crescimento e consumo de glucose. b) Fração G da biomassa. c) Produção de EPS ao longo do tempo. d) Quantidade de precipitado PC obtida ao longo do tempo. e) Variação do pH ao longo do tempo. Linha contínua: culturas controle em que o meio inicial era composto por (em g/L):

glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B₁ 0,05. Linha tracejada: culturas iguais ao controle que foram alimentadas com peptona e extrato de levedura no 13º dia aumentando a concentração de cada um destes componentes em 5 g/L. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 25 dias. Biomassa inicial $0,054 \pm 0,003$ g/L. Amostragem em triplicata.

FIGURA 10 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS PELA ALIMENTAÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA NO 13º DIA DE CULTIVO



a) Imagem do 17º dia da cultura que não foi alimentada com peptona e extrato de levedura. b) Imagem do 17º dia da cultura alimentada com peptona e extrato de levedura. Escala: 1,5 mm nas duas imagens.

O precipitado PC apresentado na figura 9d mostrou um perfil semelhante ao observado no experimento anterior (figura 8c). Novamente a quantidade de precipitado não sofreu variação significativa ao longo do tempo. Como no experimento anterior foi demonstrado que PC possui uma baixa quantidade de carboidrato (figura 8c), a quantidade de carboidrato não foi determinada nesta fração para este experimento. A grande quantidade de precipitado PC obtida desde o dia 0 mostrou que esta fração era realmente proveniente do meio de cultura. A adição de peptona e extrato de levedura no 13º dia fez com que a quantidade deste precipitado aumentasse bastante neste dia, entretanto a partir deste ponto a quantidade de PC foi a mesma que a obtida nas culturas não alimentadas. Devido ao precipitado PC ser composta por resíduos provenientes do meio, com baixa quantidade de carboidrato, esta fração não foi determinada nos próximos experimentos.

A figura 9e mostra que o pH diminuiu de um valor inicial de 4,99 para $3,48 \pm 0,08$ no 21º dia, quando a concentração de glucose no meio era de 0,1 g/L. Após este

dia houve um aumento de pH que atingiu $4,77 \pm 0,36$ no 25º dia. Este aumento de pH no final do cultivo, após a exaustão da glucose do meio, será mostrado também nos próximos cultivos. O perfil do pH após a alimentação de peptona e extrato de levedura também pode ser visto na figura 9e. Como a solução dos compostos alimentados possuía um pH superior a 6,0, esta proporcionou um aumento do pH do meio no momento da sua introdução. Apesar disto, o pH voltou a diminuir, seguindo o mesmo perfil das culturas não alimentadas.

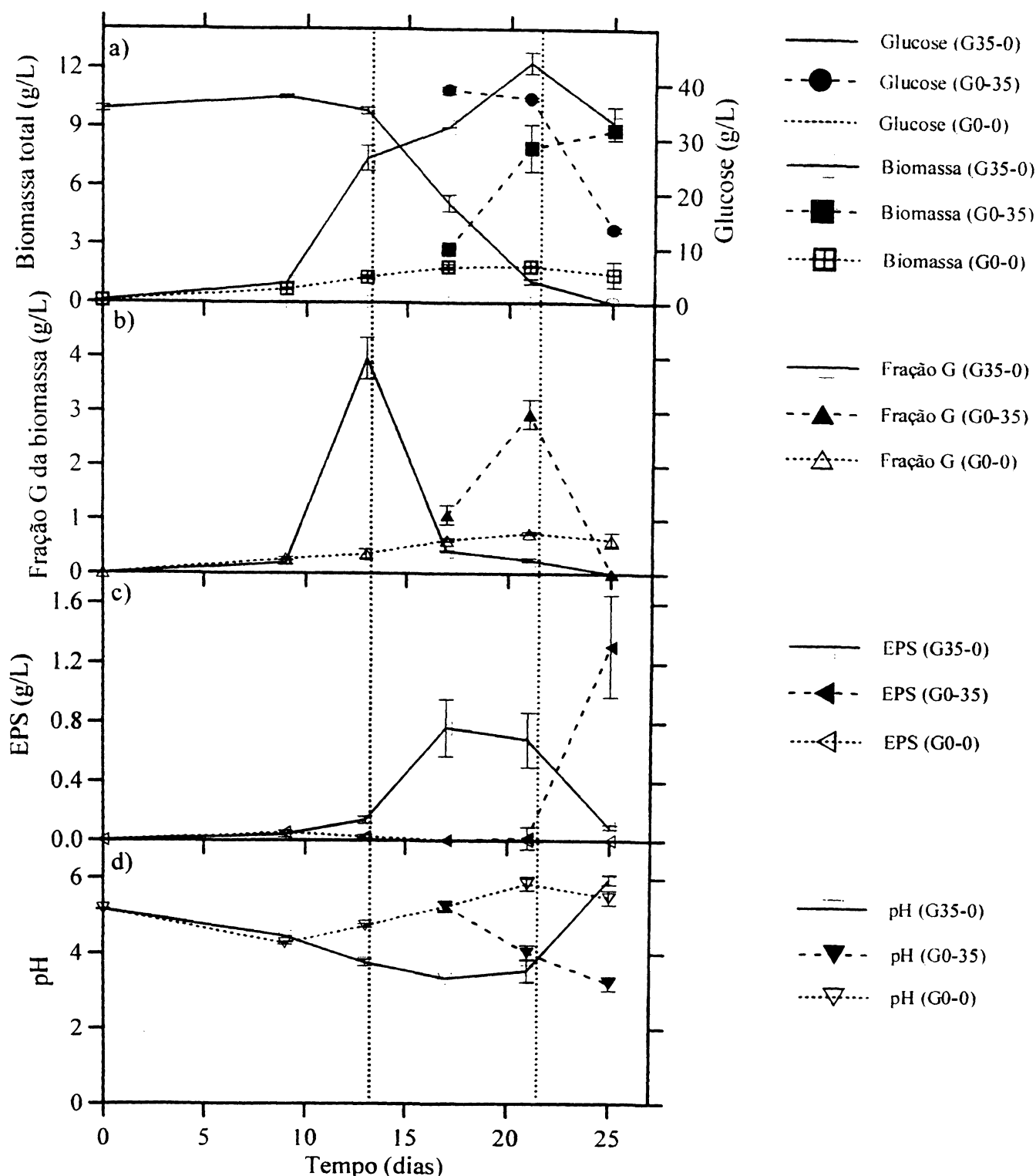
5.1.3 Efeitos da Glucose na Morfologia e Fisiologia e Produção de EPS

Ao se descartar a hipótese apresentada em 5.1.2 procurou-se estudar outras peculiaridades do comportamento observado. O fato de uma quantidade significativamente grande de biomassa ter sido obtida antes do início do consumo da glucose nos experimentos anteriores (figuras 5a e 8a) e a observação de que a redução da concentração de glucose no meio ocorreu de forma simultânea a desagregação dos *pellets* fez com que se procurasse observar o papel da glucose no crescimento e na morfologia de *G. lucidum*. A figura 11a mostra os perfis de crescimento e consumo de glucose em três diferentes condições de cultivo: com glucose 35 g/L desde o início do cultivo (cultura G35-0), sem glucose durante todo o cultivo (cultura G0-0) e sem glucose até o 17º dia, quando então, adicionou-se glucose no meio em quantidade suficiente para proporcionar uma concentração de 35 g/L (cultura G0-35).

A presença de glucose no meio, mesmo que não consumida, causou uma enorme diferença no crescimento. A concentração de biomassa nas culturas G35-0 foi de $7,4 \pm 0,6$ g/L no 13º dia, quando a concentração de glucose no meio ainda era de $35,0 \pm 0,6$ g/L. Isto proporcionaria um fator de conversão de substrato em biomassa de 0,74 caso toda a massa de peptona e extrato de levedura tivesse sido consumida antes do início do consumo da glucose. Em contraste, a concentração de biomassa nas culturas nas quais a glucose estava ausente (G0-0) era de $1,3 \pm 0,1$ g/L no mesmo dia e a concentração máxima alcançada nesta condição foi de $2,7 \pm 0,2$ g/L no 17º dia.

A concentração de biomassa aumentou bastante após a adição de glucose nas culturas que tinham sido incubadas na ausência deste açúcar. Entretanto, apesar de a concentração de biomassa ter aumentado em 5,2 g/L após quatro dias da alimentação, não se observou um consumo significativo de glucose durante este período, sendo que a sua concentração havia diminuído de $38,8 \pm 0,7$ g/L no dia da alimentação para $37,3 \pm 0,3$ g/L após 4 dias. Isto mostra que apesar de o fungo não consumir a glucose, a presença deste açúcar estimulou o crescimento do micélio a partir do consumo de outros nutrientes presentes no meio. A análise dos fatores de conversão de substrato em biomassa mostra isso de forma mais clara: quando a glucose não estava presente o fator de conversão era de 0,18 g-biomassa/g-extrato de levedura e peptona (considerando consumo de toda a massa inicial destes substratos), entretanto nas culturas alimentadas este fator de conversão aumentou para 0,79 g-biomassa/g-peptona e extrato de levedura, considerando apenas o crescimento obtido até o início do consumo da glucose do meio. Este aumento do fator de conversão de substrato em biomassa foi de 339%.

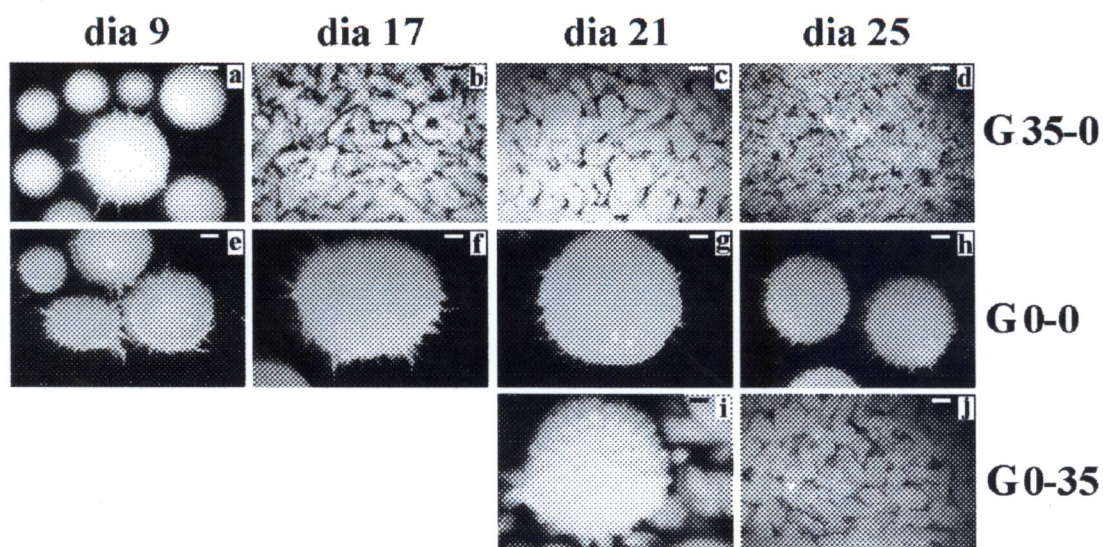
FIGURA 11 – EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO II APÓS 17 DIAS SEM GLUCOSE



a) Curva de crescimento e consumo de glucose. b) Fração G da biomassa. c) Produção de EPS ao longo do tempo. d) Variação do pH ao longo do tempo. Linha contínua: culturas controle (G35-0) em que o meio inicial era composto por (em g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Linha pontilhada: culturas iguais ao controle exceto pela ausência de glucose (G0-0). Linha tracejada: Culturas iniciadas sem glucose, mas que foram alimentadas com glucose no 17º dia (G0-35), resultando em uma concentração de 35 g/L deste açúcar. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 25 dias. Biomassa inicial $0,081 \pm 0,001$ g/L. Amostragem em duplicata.

A desagregação dos *pellets* também foi afetada pela adição de glucose. Na figura 11b é possível ver o aumento de biomassa na fração G até o 13° dia nas culturas G35-0 e do 17° ao 21° dia nas culturas alimentadas com glucose. Este aumento foi seguido por uma drástica diminuição nos dias subseqüentes, correspondendo a desagregação dos *pellets*. Um perfil morfológico diferente foi observado quando *G. lucidum* foi incubado sem glucose durante todo o experimento. A fração G nestas culturas aumentou no início e permaneceu constante até o final do cultivo porque não houve desagregação dos *pellets* de primeira geração e, portanto, não houve liberação de *pellets* de segunda geração. O aspecto morfológico dos *pellets* nas diferentes culturas pode ser observado na figura 12. Os *pellets* das culturas G0-0 e G0-35, até o momento da adição de glucose, possuíam alguns resquícios de protuberâncias, formadas nas fases iniciais do cultivo. Após a adição de glucose nas culturas G0-35, estes resquícios de protuberâncias aumentaram de tamanho, mas seu formato continuou distinto daquele apresentado nas culturas G0-35. Após o aumento do tamanho das protuberâncias ocasionado pela adição de glucose, houve fragmentação dos *pellets* de primeira geração com liberação de *pellets* de segunda geração.

FIGURA 12 - EFEITO DA GLUCOSE NA MORFOLOGIA



G35-0: com 35 g/L de glucose no início do cultivo. G0-0: sem glucose no início do cultivo. G0-35: sem glucose no início do cultivo e alimentadas com 35 g/L de glucose no 17° dia. Meio de cultura e condições de cultivo descritos na legenda da figura 11. Escala: 1,5 mm em todas as imagens.

Ao contrário do que se observou nas culturas incubadas com glucose desde o início, a biomassa que cresceu aderida à parede interna do frasco (fração A) possuía uma consistência menos rígida nas culturas sem glucose e esta fração não permaneceu aderida até o final do cultivo. No 17º dia esta fração havia caído no meio líquido em todos os frascos sem glucose ao passo que nos frascos com glucose esta fração ainda permaneceu aderida.

Os perfis de produção de EPS nas diferentes culturas podem ser visto na figura 11c. Nas culturas em que a glucose estava ausente, houve uma pequena produção de EPS que foi notada até o 13º dia, chegando ao máximo de $0,05 \pm 0,01$ g/L no 9º dia. Após o 13º dia não foi constatada a presença de EPS nas culturas sem glucose. Por outro lado, a alimentação de glucose nestas culturas promoveu um aumento acentuado de EPS, chegando a $1,3 \pm 0,3$ g/L no 25º dia. Este valor foi 72% maior que a concentração máxima de EPS obtida nas culturas controle (com glucose desde o início) que foi de $0,8 \pm 0,2$ g/L no 17º dia. Estes resultados mostram que a biomassa formada na ausência de glucose apresenta maior capacidade de produzir polissacarídeos quando entra em contato com a glucose se comparado com a biomassa que cresceu desde o início na presença de glucose.

Imediatamente após a introdução da glucose, a resposta principal observada foi o estímulo no crescimento, com aumento de biomassa de 5,2 g/L entre o 17º e 21º dia. Neste período o aumento de EPS foi inferior a 0,2 g/L. Já entre o 21º e 25º dia observou-se um segundo efeito da alimentação de glucose, sendo a produção de EPS a resposta principal, aumentando em 1,1 g/L, enquanto a concentração de biomassa aumentou apenas 0,92 g/L.

O perfil de pH nas culturas G35-0, G0-0 e G0-35 pode ser visto na figura 11d. Após 9 dias de cultivo observou-se uma redução do pH de 5,2 para 4,4 nas culturas G35-0 e para 4,3 nas culturas G0-0. Nas culturas em que a glucose estava presente (G35-0) o pH continuou caindo até o 17º dia, alcançando a marca de 3,3. Por outro lado nas culturas sem glucose (G0-0) o pH aumentou entre o 9º e o 21º dia quando chegou a 5,8. Um aumento do pH também foi observado quando a glucose se encontrava em baixas concentrações nas culturas G35-0. Este aumento de pH foi

muito mais intenso após o consumo completo da glucose do meio, chegando a alcançar 5,9 no 25º dia. Fica claro que a presença de glucose faz com que o pH caia, mesmo sem este açúcar ter sido consumido. Com a adição da glucose, no 17º dia, nas culturas G0-35, o pH do meio diminuiu linearmente chegando a 4,0 no 25º dia.

Na figura 13 estão apresentados os cromatogramas das análises de CLAE, das amostras das culturas G35-0, G0-0 e G35-0, retiradas em diferentes dias. O pico referente a glucose está indicado com a letra G. Nota-se que a partir do 9º dia é possível identificar o surgimento de um pico A nas culturas G35-0 e G0-0. Este pico, que apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão de ácido oxálico (tabela 3), aumentou até um tamanho que permaneceu constante até o fim do cultivo.

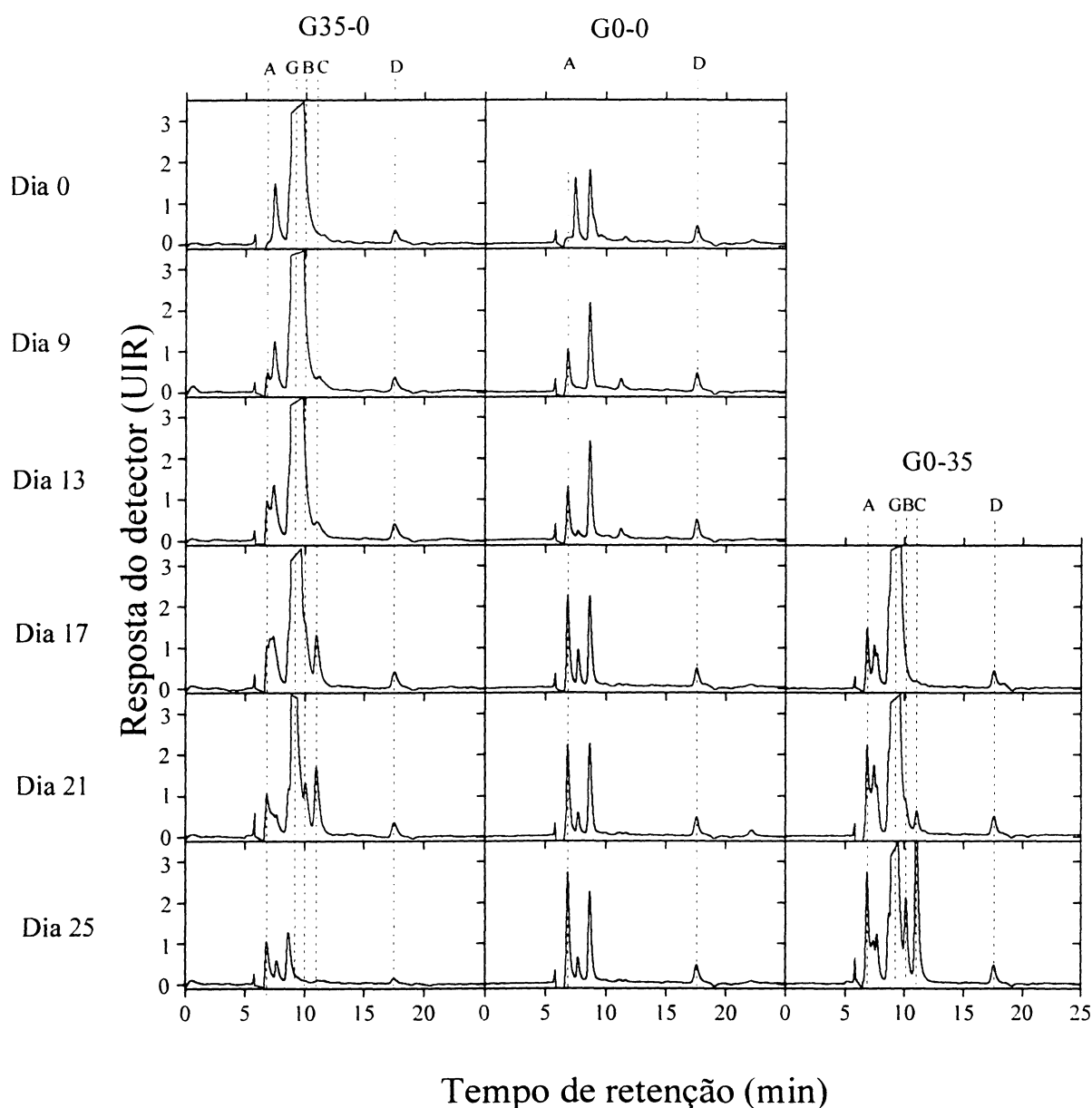
Nas culturas G35-0 os picos B e C aparecem somente a partir do 17º dia, quando a glucose estava sendo consumida. Estes picos apresentaram um tempo de retenção diferente de todos os padrões de ácidos orgânicos testados (tabela 3). Nas culturas G0-0 os picos B e C não foram detectados, entretanto 4 dias após a introdução da glucose (21º dia nas culturas G0-35) foi possível detectá-los. O pico B só é percebido pelo aparecimento de um ombro no pico da glucose. Somente no 25º dia (na cultura G0-35), quando a concentração de glucose do meio estava menor, foi possível ver o pico B com uma maior resolução.

Na figura 14 são comparados os cromatogramas obtidos por detecção do índice de refração (linha contínua) e absorção no UV (linha tracejada). Nesta figura são apresentados os cromatogramas da solução de peptona e extrato de levedura e da solução de glucose utilizadas como meio de cultura e da amostra G0-35 retirada no 21º dia. Analisando esta figura, é possível dizer que o pico D é proveniente da peptona e do extrato de levedura. Este pico, que nas culturas G35-0 diminuiu somente após a exaustão da glucose, apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão de ácido propiônico (tabela 3).

Nas culturas G0-35 os picos B e C também desapareceram após a exaustão da glucose (figura 13), entretanto é improvável que as substâncias representadas por estes picos sejam as responsáveis pela queda do pH porque como elas não absorveram significativamente na região do ultravioleta (figura 14) descarta-se a possibilidade de

que estas substâncias sejam ácidos orgânicos, uma vez que o grupamento cromóforo carboxila absorve em 205 nm.

FIGURA 13 – EFEITOS DA GLUCOSE NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS AO LONGO DO TEMPO

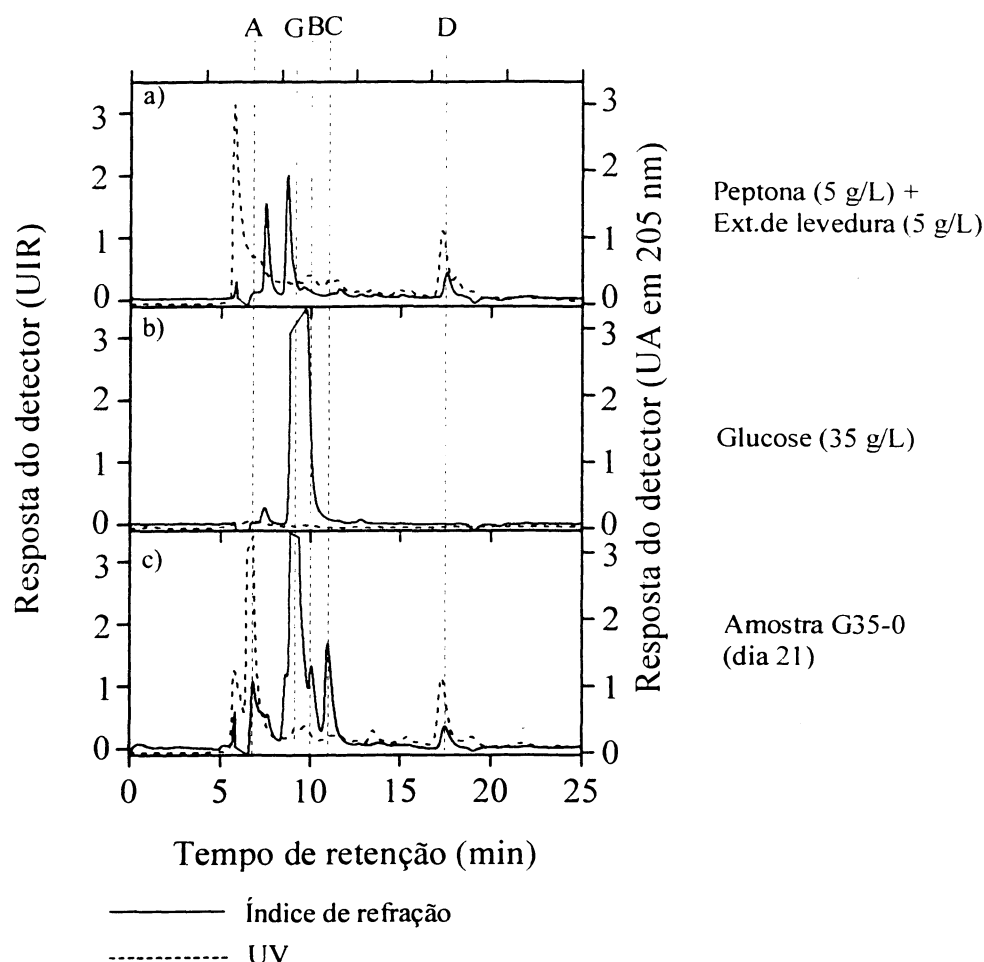


Cromatogramas obtidos por CLAE. G35-0: com 35 g/L de glucose no início do cultivo. G0-0: sem glucose no início do cultivo. G0-35: sem glucose no início do cultivo e alimentadas com 35 g/L de glucose no 17º dia. Meio de cultura e condições de cultivo descritos na legenda da figura 11. Picos: A (mesmo t_r do ácido oxálico); B e C (substâncias desconhecidas); D (mesmo t_r do ácido propiônico); G (glucose).

TABELA 3 - TEMPO DE RETENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PADRÃO E DOS PICOS NOS CROMATOGRAMAS DA FIGURA 13

Substância / PICO	Tempo de retenção (min)
Ácido Oxálico	6,8
PICO A	6,8
Ácido Cítrico	8,0
Ácido Maléico	8,6
Pico G (glucose)	9,0
PICO B	10,0
PICO C	10,9
Ácido Láctico	12,8
Ácido Fumárico	13,7
Ácido Fórmico	13,8
Ácido acético	15,0
Ácido propiônico	17,5
PICO D	17,5
Ácido butanóico	21,3
Ácido Valérico	28,7

FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE DO MEIO DE CULTURA E DE UMA AMOSTRA G35-0



a) Cromatograma de uma solução de peptona a 5 g/L e extrato de levedura a 5 g/L. b) Cromatograma de uma solução de glucose a 35 g/L. c) Cromatograma de uma amostra G35-0 retirada no 21º dia de cultivo. Os cromatogramas em linha contínua foram obtidos por detecção de índice de refração. Os cromatogramas em linha tracejada foram obtidos por detecção da absorção ao ultra violeta em 205 nm. Picos: A (mesmo t_r do ácido oxálico); B e C (substâncias desconhecidas); D (mesmo t_r do ácido propiônico); G (glucose).

5.1.4 Determinação da Concentração de Glucose no BDA (Culturas no estágio I)

A determinação da concentração de glucose no meio sólido do estágio I mostrou que nestas culturas ainda havia glucose no momento que foram utilizadas como inóculo para o estágio II. Em duas lâminas de BDA com área de 1cm^2 , retiradas de regiões distintas da cultura, a concentração de glucose era de 11,5 g/L em uma lâmina com espessura de 0,06 mm e 8,7 g/L em outra lâmina com 0,11 cm de espessura.

5.2 ESTUDOS NA FERMENTAÇÃO PRINCIPAL (CULTURAS NO ESTÁGIO III)

Quando o mesmo meio usado nos experimentos anteriores foi inoculado com micélio de 16 dias de idade, cultivado em meio líquido, o perfil das culturas foi um pouco diferente daquele observado nas culturas cujo inóculo provinha do meio sólido (BDA em garrafa de Roux).

5.2.1 Observações Preliminares em Culturas no Estágio III

A figura 15a mostra que, apesar de já ter havido consumo de glucose após 4 dias de cultivo, o consumo deste açúcar foi inicialmente mais lento do que o observado nas fases posteriores do cultivo. Entre os dias 0 e 4 houve um consumo de 5,8 g/L de glucose para um aumento de biomassa de 4,5 g/L. Isto resulta em um fator de conversão de substrato em biomassa de 0,77 g-biomassa/g-glucose, que é maior do que o aproximadamente 0,5 g-biomassa/g-glucose esperado para o crescimento em glucose como única fonte de carbono, indicando que peptona e extrato de levedura também foram consumidos neste período. Já entre os dias 4 e 10 o fator de conversão de substrato em biomassa foi de 0,23 g-biomassa/g-glucose, pois neste período a concentração de glucose caiu 24,7 g/L enquanto a biomassa aumentou em 5,6 g/L

O crescimento apresentou-se linear com uma velocidade de 1,01 g/(L.dia) (com R^2 de 0,996) desde o momento do inóculo até o 10º dia, quando obteve-se a máxima concentração de biomassa ($10,3 \pm 0,4$ g/L).

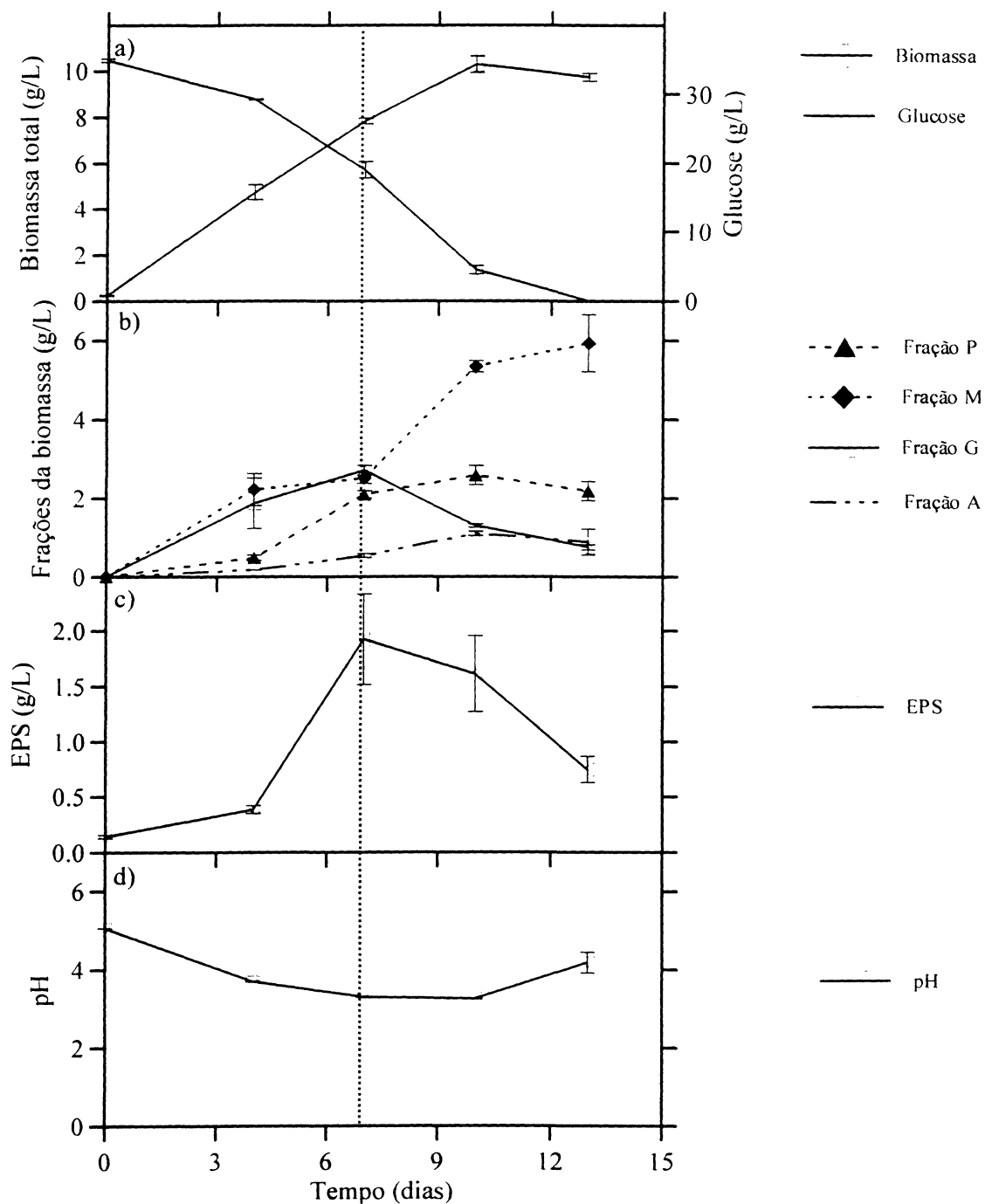
Um perfil de desagregação de *pellets* semelhante ao observado nas culturas no estágio II foi observado nas culturas no estágio III. No estágio II os *pellets* de primeira geração apresentaram inúmeras protuberâncias que aumentaram de tamanho e se destacaram do centro do *pellet* inicial, por volta do 13º-15º dia, originando um grande número de *pellets* de segunda geração (figura 5). Na figura 16 estão mostradas as imagens dos *pellets* durante o cultivo no estágio III. Neste estágio os *pellets* de segunda geração já estavam bem desenvolvidos após 7 dias de cultivo, entretanto a liberação destes *pellets* do centro do *pellet* de primeira geração foi mais lenta que a

observada nas culturas no estágio II. Observa-se que, no 4º dia, os *pellets* de primeira geração possuíam uma grande quantidade de protuberâncias, que se desenvolveram, até o 7º dia, tomando o formato de grão de arroz. Entretanto, estes *pellets* de segunda geração permaneceram ligados ao *peillet*-mãe por mais tempo do que o observado no estágio II, sendo que a sua liberação aconteceu de forma mais intensa somente entre o 7º e 10º dia. Isto deve ser comparado com a cultura no estágio II, onde a maioria das protuberâncias se destacou antes de darem origem aos *pellets* de segunda geração com formato de “grão de arroz”. Os *pellets* de primeira geração do estágio III antes de liberarem as protuberâncias também apresentavam um centro oco, ao serem seccionados transversalmente e observados no microscópio (imagens não mostradas).

A figura 15b mostra a distribuição da biomassa nas frações P, M, G e A. No momento do inóculo, a biomassa estava distribuída entre as frações P e M (dados não mostrados). Até o 4º dia os *pellets* aumentaram de tamanho, por isso a fração M foi a predominante. Apenas alguns *pellets* aumentaram de tamanho de tal forma a integrarem a fração G. Do 4º ao 7º dia o acontecimento principal foi ainda o aumento de tamanho dos *pellets*, resultando no aumento da fração G. A fração M permaneceu constante porque enquanto uma parte dos fragmentos desta fração estava aumentando de tamanho e passando para a fração G, outra parte estava vindo da fração G em resposta a desagregação de alguns *pellets*. A fração P também aumenta em resposta a esta desagregação e em resposta ao próprio crescimento dos fragmentos que a constituem. Do 7º ao 10º dia, a desagregação dos *pellets* é o processo predominante. Isto resulta em uma diminuição da fração G e aumento da fração M. A fração P permanece constante porque os *pellets* de 2º geração liberados são na sua maioria maiores que 0,8 mm de diâmetro, sendo assim retidos pela fração M.

Durante os primeiros quatro dias de cultivo, houve um pequeno consumo de glucose e uma baixa produção de EPS (figuras 15a e 15c). Após o 4º dia, quando o consumo de glucose passou a ser maior, notou-se um aumento na velocidade de produção de EPS. Esta velocidade, que era de 0,06 g/(L.dia) até o 4º dia, passou a ser de 0,51 g/(L.dia) entre o 4º e 7º dia, quando obteve-se a máxima concentração de EPS (1,92 g/L).

FIGURA 15 - PERFIL DAS CULTURAS NO ESTÁGIO III



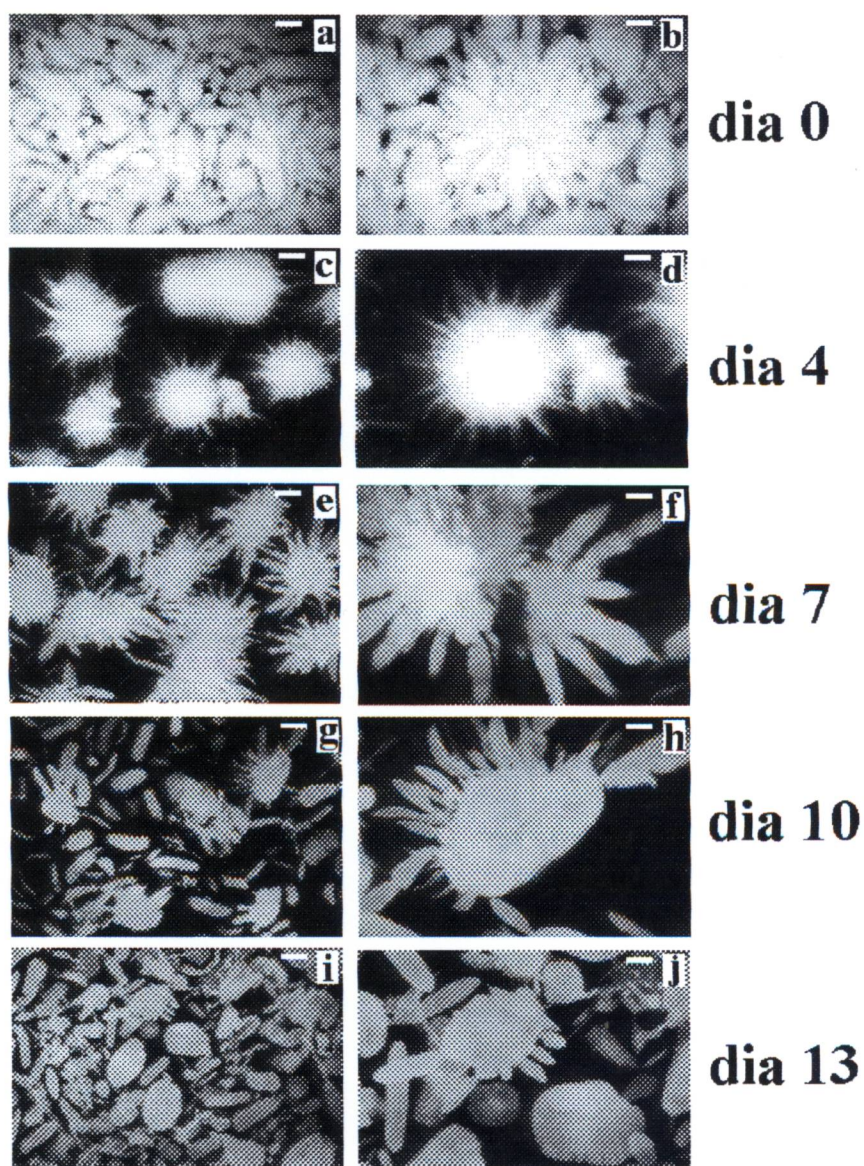
a) Curva de crescimento e consumo de glucose. b) Distribuição da biomassa em diferentes frações. c) Produção de EPS ao longo do tempo. d) Variação do pH ao longo do tempo. Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B₁ 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 13 dias. Biomassa inicial $0,24 \pm 0,02$ g/L. Amostragem em triplicata.

O pH do meio no estágio III está apresentado na figura 15d e possui o mesmo perfil observado no estágio II (figuras 6b, 9e e 11d). A queda do pH ocorreu de forma mais intensa no início do cultivo, enquanto a glucose estava sendo pouco consumida. Nos primeiros quatro dias de cultivo o pH reduziu de 5,0 para 3,7. Quando a glucose passou a ser utilizada de forma mais intensa o pH não sofreu muita alteração, diminuindo de 3,7 no 4º dia para 3,3 no 7º dia e então permanecendo constante até o 10º dia. Após o consumo completo da glucose do meio o pH aumentou chegando a 4,2 no 13º dia.

5.2.2 Efeito da Concentração do Inóculo nas Culturas no Estágio III

No experimento anterior, o inóculo das culturas consistiu de 5 mL de uma cultura no estágio III, com 16 dias de idade, diluída 1,5 vezes. Observando-se que o crescimento nestas culturas ocorreu de forma linear desde o momento do inóculo até o 10º dia, com uma velocidade de crescimento de 1,01 g/(L.dia) questionou-se qual seria o efeito de um inóculo mais concentrado. Desta forma realizou-se um experimento comparativo entre dois grupos de frascos, o primeiro utilizando a mesma forma de inóculo do experimento anterior (cultura B) e o segundo utilizando 10 mL da cultura no estágio II sem ter sido diluída (cultura A). A concentração inicial de biomassa, em termos de massa seca, nas cultura inoculadas foi de 594 ± 4 mg/L para as culturas A e 137 ± 15 mg/L para as culturas B.

Na figura 17a pode-se ver que o perfil de crescimento em ambas as culturas é semelhante, com crescimento linear desde o momento do inóculo até o 10º dia. As velocidades de crescimento em ambas as culturas foram semelhantes, sendo de 0,93 g/(L.dia) (com $R^2 = 0,99$) quando a concentração de biomassa inicial foi de 137 mg/L (cultura B) e de 1,12 g/(L.dia) (com $R^2 = 1,00$) quando a concentração de biomassa inicial foi de 594 mg/L (cultura A). Estes resultados mostram que a concentração do inóculo exerceu pouca influência sobre a velocidade de crescimento do fungo, pois um aumento de 333% na concentração inicial de biomassa causou um aumento de apenas 20% na velocidade de crescimento.

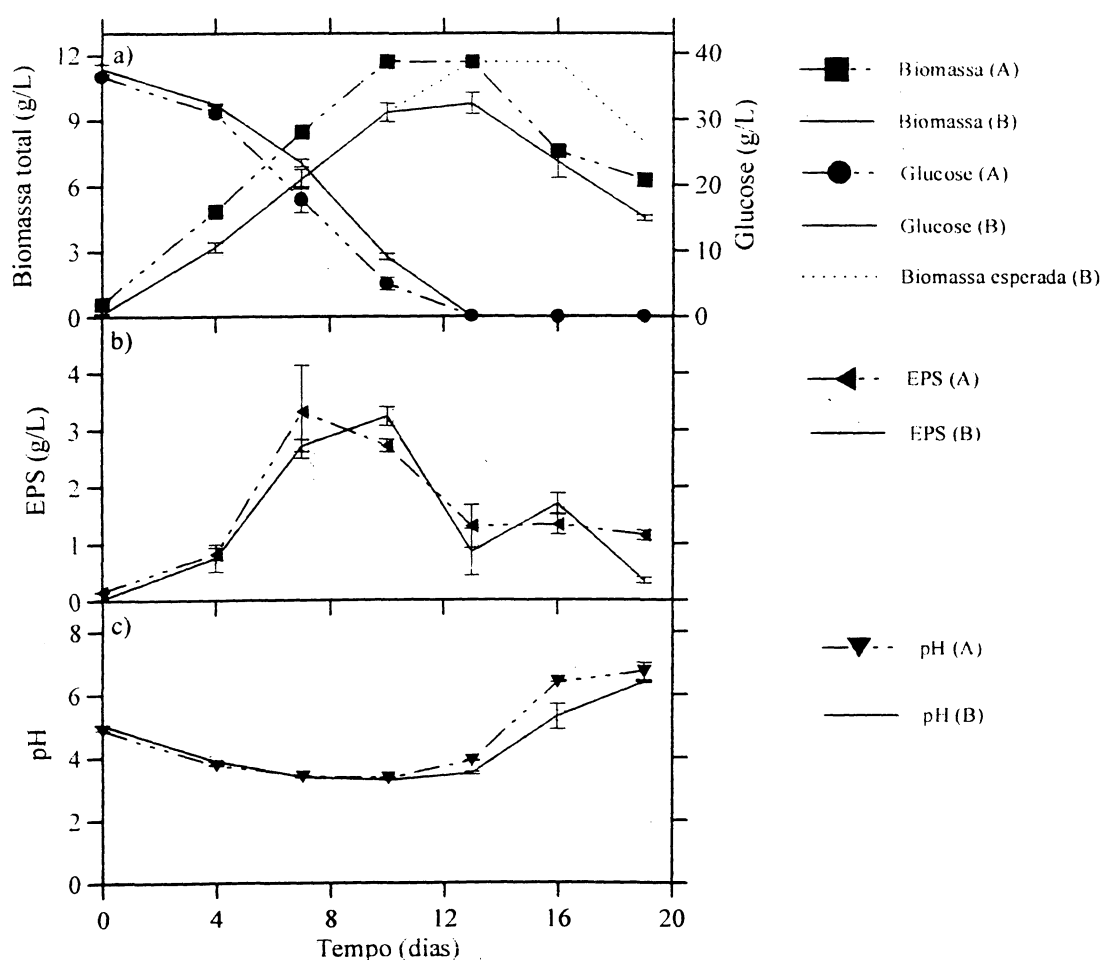
FIGURA 16 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ESTÁGIO III

As imagens da coluna da direita são ampliações de um ponto das imagens da coluna da esquerda. Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B₁ 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 13 dias. Biomassa inicial $0,24 \pm 0,02$ g/L. Escala: a) 1,25 mm; b) 0,8 mm; c) 1,25 mm; d) 0,6 mm; e) 1,5 mm; f) 0,5 mm; g) 1,5 mm; h) 0,5 mm; i) 1,5 mm; j) 0,6 mm.

Um resultado não esperado foi a diferença significativa na quantidade máxima de biomassa obtida em ambas as culturas. Na cultura A a concentração máxima de biomassa foi de $11,7 \pm 0,1$ g/L no 10º dia, já na cultura B o máximo de biomassa alcançado foi de $9,8 \pm 0,5$ g/L, no 13 º dia, um diferença de 19,3%. Esperava-se que

ambas as culturas proporcionassem essencialmente a mesma concentração máxima de biomassa porque ambos tinham a mesma quantidade de nutrientes disponível e a diferença na biomassa inicial foi menor que 0.5 g/L. mas isso não aconteceu. A linha tracejada sem símbolos na figura 17a representa o perfil de crescimento esperado para a cultura B. Como a concentração de biomassa era menor nesta cultura, se comparada à cultura A no mesmo período, esperava-se que a fase de crescimento linear fosse prolongada até atingir um máximo de biomassa igual ao da cultura A. entretanto, a fase linear em ambas as culturas teve a mesma duração.

FIGURA 17 – EFEITO DO INÓCULO NAS CULTURAS DE ESTÁGIO III



a) Curva de crescimento de consumo de glucose. b) Produção de EPS ao longo do tempo. c) Variação do pH ao longo do tempo. Meio de cultura (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm, 29 °C no escuro por 19 dias. Linha tracejada (culturas A): com biomassa inicial de $0,594 \pm 0,004$ g/L. Linha contínua (culturas B): com biomassa inicial de $0,137 \pm 0,015$ g/L. A linha pontilhada sem símbolos na figura (a) representa a curva de crescimento esperada.

O consumo de glucose apresentou o mesmo perfil observado no experimento anterior, sendo o consumo mais lento no início do cultivo, tanto para a cultura A como para a cultura B. Entretanto, como na cultura A havia uma maior concentração de biomassa do que na cultura B, no mesmo período, o consumo de glucose na cultura A foi sempre maior.

A figura 17b mostra que a produção de EPS, seguiu um perfil semelhante ao experimento anterior. A concentração máxima de EPS na cultura A ocorreu no 7º dia e foi de 3.3 ± 0.8 g/L, enquanto a produção máxima de biomassa desta cultura ocorreu no 10º dia. A concentração máxima de EPS obtida na cultura B foi de 2.7 ± 0.1 g/L, no 10º dia. Devido a grande dispersão dos dados, o que pode ser visto pelas barras de erro na figura 17b, a produção de EPS na cultura A não é estatisticamente diferente do que na cultura B.

O perfil de pH foi semelhante ao observado nos experimentos anteriores. Este pode ser dividido em três fases:

- a) redução do pH até um valor inferior a 4.0 nos 4 primeiros dias de cultivo;
- b) manutenção de um pH em torno de 3 até o 13º dia;
- c) aumento do pH até valores superiores a 6.0 após a exaustão da glucose do meio.

Pode-se ver na figura 17c que o perfil do pH foi semelhante nas duas culturas.

5.2.3 Efeito da Alimentação de Glucose nas Culturas no Estágio III

Com o objetivo de obter um maior rendimento de biomassa e exopolissacarídeos em uma cultura no estágio III, realizou-se uma alimentação de glucose no 10º dia de cultivo, aumentando a sua concentração em 35 g/L, quando a concentração deste açúcar no meio era de 5.0 ± 1.0 g/L. Esta alimentação foi realizada em um grupo de frascos da cultura A, descrita no experimento anterior.

O perfil de crescimento e consumo de glucose está mostrado na figura 18a. A alimentação ocorreu no dia em que se obteve a máxima concentração de biomassa na cultura normal (11.7 ± 0.3 g/L). Na cultura alimentada observou-se que o crescimento

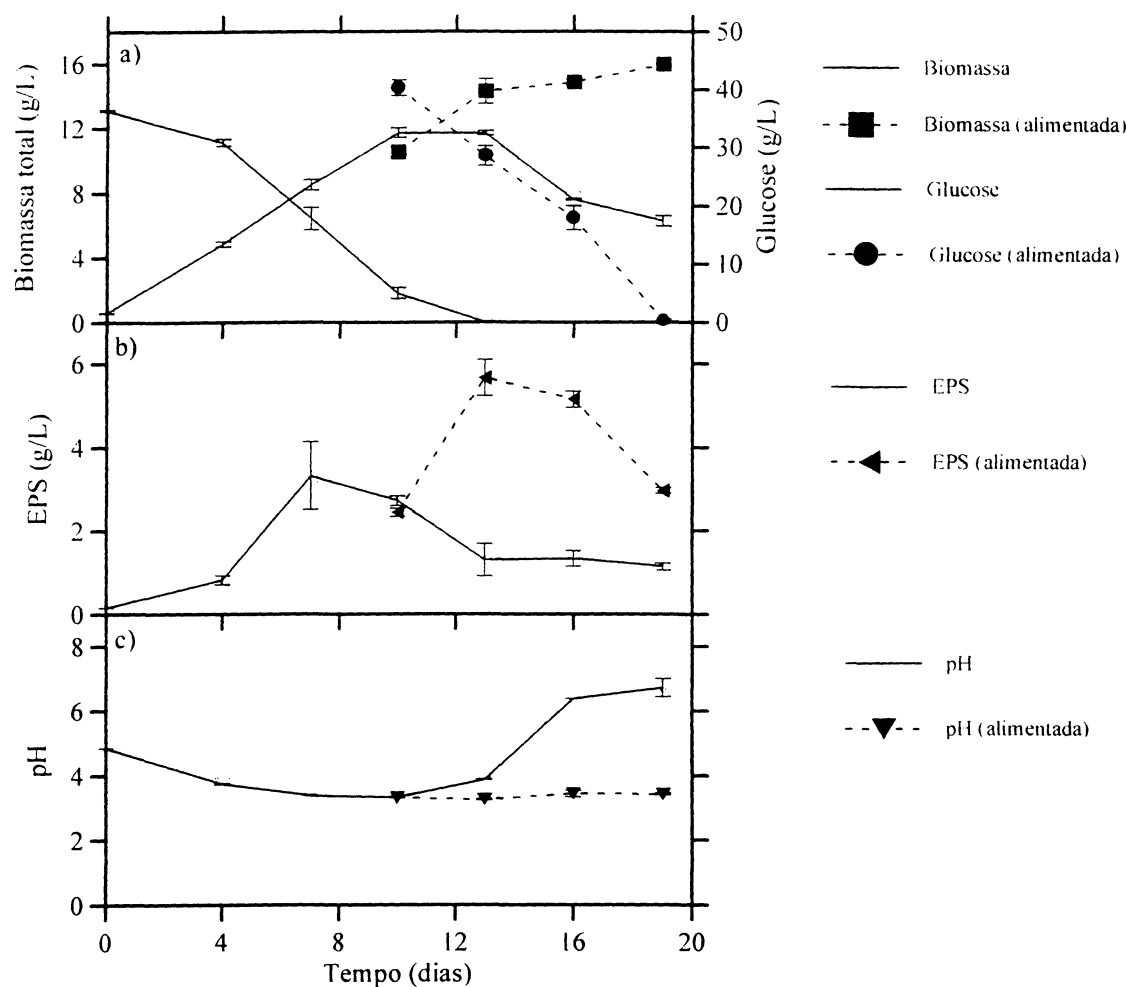
foi mantido por mais 9 dias enquanto no controle (cultura não alimentada), a cultura entrou na fase estacionária e em seguida na fase de declínio. A curva de crescimento na cultura alimentada manteve a mesma inclinação que o controle até o 13º dia. Deste momento em diante o crescimento foi mais lento do que o observado anteriormente. A concentração máxima de biomassa na cultura alimentada foi 37% maior que no controle, sendo de $16,0 \pm 0,0$ g/L no 19º dia. Apesar de este ter sido o último dia de cultivo, é improvável que o rendimento pudesse ser maior caso a cultura fosse mantida por mais tempo. A concentração de glucose no meio era de $0,4 \pm 0,2$ g/L e tanto no controle como nos experimentos anteriores observa-se que a quantidade de biomassa permanece constante e depois diminui quando os níveis de glucose estão abaixo de 5,0 g/L.

A curva de produção de EPS nas culturas alimentada e controle pode ser vista na Figura 18b. A produção de EPS foi 73% maior na cultura alimentada, sendo de $5,7 \pm 0,4$ g/L no 13º dia. Já na cultura sem alimentação a produção máxima de EPS foi de $3,3 \pm 0,8$ g/L no 7º dia.

O perfil de pH mostrado na figura 18c confirma o que já foi mostrado anteriormente: a presença da glucose faz com que o pH permaneça baixo. Quando a glucose foi totalmente consumida o pH aumentou para valores acima de 6,0, entretanto o aumento da concentração deste açúcar no meio fez com que o pH permanecesse entre 3,2 e 3,4.

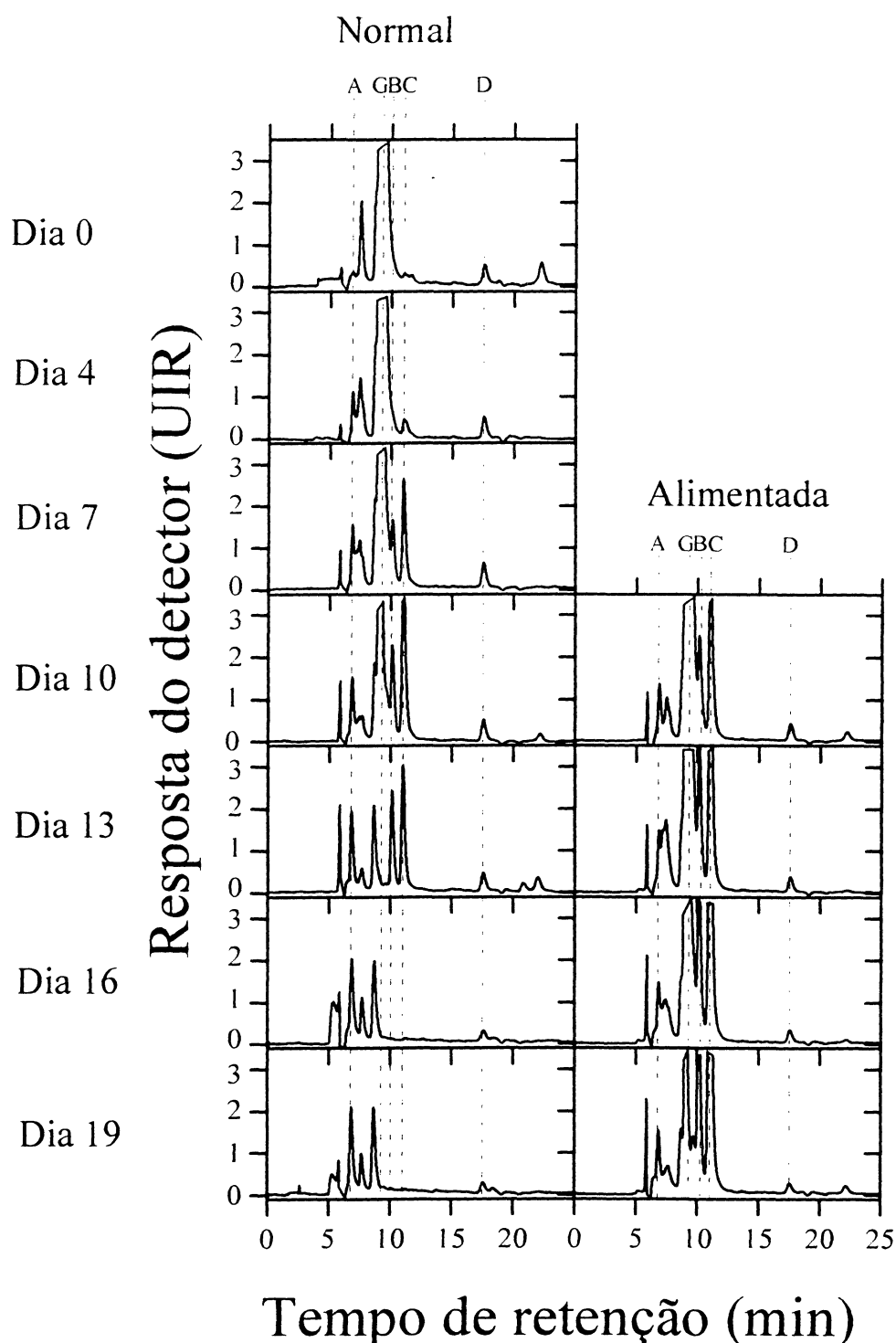
Na figura 19 são apresentados os cromatogramas de CLAE das culturas no estágio III com e sem alimentação de glucose no 10º dia. Nota-se que o perfil cromatográfico foi semelhante ao da cultura no estágio II (figura 13). Entretanto, a altura dos picos B e C foi maior no estágio III do que no estágio II e a alimentação de glucose no estágio III resultou em um aumento ainda maior destes picos. De forma contrária, a adição de mais glucose não causou aumento no pico A, que apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão de ácido oxálico (tabela 3).

FIGURA 18 - EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NAS CULTURAS NO ESTÁGIO III



a) Curva de crescimento e consumo de glucose. b) Produção de EPS ao longo do tempo. c) Variação do pH ao longo do tempo. Linha contínua: culturas controle cujo meio inicial era composto por (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Linha tracejada: culturas cujo meio inicial era igual ao das culturas controle e que no 10º dia foram alimentadas com uma segunda quantidade de glucose elevando a concentração deste açúcar em 35 g/L. Condições: pH inicial 5,0; 128 rpm. 29 °C no escuro por 19 dias. Biomassa inicial de $0,594 \pm 0,004$ g/L.

FIGURA 19 – EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS CULTURAS NO ESTÁGIO III



Cromatogramas obtidos por CLAE. Na coluna da esquerda estão dispostos os cromatogramas de amostras das culturas com o meio normal no início (g/L): glucose 35,0; peptona 5,0; extrato de levedura 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B_1 0,05. Na coluna da direita estão mostrados os cromatogramas de amostras das culturas que inicialmente tinham o mesmo meio normal, mas que no 10º dia foram alimentadas com uma segunda quantidade de glucose elevando a concentração deste açúcar no meio em 35 g/L. Picos: A (mesmo t_r do ácido oxálico); B e C (substâncias desconhecidas); D (mesmo t_r do ácido propiônico); G (glucose).

5.3 ANÁLISE PRELIMINAR DE CARBOIDRATOS

5.3.1 Análise dos Exopolissacarídeos Produzidos nos Estágios II e III

O resultado das análises da composição monossacarídica das diferentes amostras de EPS está mostrado na tabela 4. A descrição das amostras está apresentada na tabela 2, na seção 4.16.

Observa-se que em todas as amostras o monossacarídeo predominante foi a glucose. Entretanto, para quase todas as amostras encontrou-se quantidades menores de manose galactose e arabinose, além de traços de xilose, fucose e ramnose.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE DIFERENTES AMOSTRAS DE EPS

Amostra	Composição monossacarídica (%)							Referência das amostras
	Glc	Man	Gal	Ara	Xyl	Fuc	Rha	
GLII-SL	53,7	25,2	20,0	Tr.	Tr.	1,1	Tr.	Exper. preliminar, tipo G35-0, dia 15
GLII-NR	74,4	13,3	7,6	3,6	1,1	Tr.	Tr.	Fig. 11c, amostra G35-0, dia 17
GLII-AL	100,0	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Fig. 11c, amostra G0-35, dia 25
GLIII-NR	82,5	8,2	2,8	6,5	Tr.	Tr.	Tr.	Fig. 18b, amostra normal, dia 7
GLIII-AL	76,0	9,9	5,2	6,8	Tr.	1,3	Tr.	Fig. 18b, amostra alimentada, dia 13

As amostras de EPS foram coletadas no dia em que a sua concentração no meio de cultivo foi a máxima obtida durante todo o cultivo.

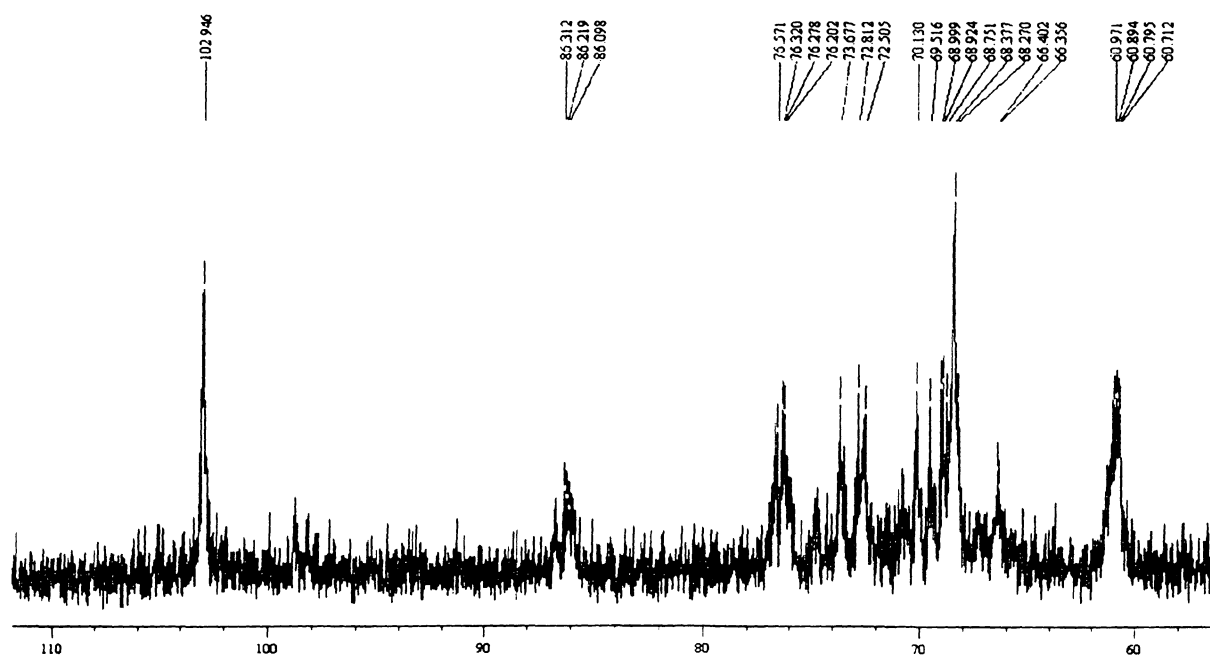
A amostra GII-AL, que foi obtida a partir da alimentação de glucose nas culturas mantidas sem glucose até o dia 17º, é a que mais diferiu entre as demais amostras. Nesta amostra a proporção de glucose foi de aproximadamente 100% pois foram encontrados apenas traços dos demais monossacarídeos.

A amostra GLII-SL, que foi obtida a partir do meio de cultivo sem que o micélio fosse lavado com água, possui uma relação glucose, manose e galactose de 2:1:1 sendo encontrados apenas traços de arabinose.

Na amostra GII-NR, que representa o EPS do estágio II obtido a partir do meio de cultivo e da água de lavagem do micélio, a proporção de glucose e manose foi de 5:1 e a proporção de manose, galactose e arabinose foi 4:2:1.

Na amostra GLIII-NR, que representa o EPS obtido a partir de uma cultura normal no estágio III, a relação entre glucose e manose foi ainda maior, sendo de aproximadamente 10:1. Nesta amostra a relação entre manose, galactose e arabinose foi de 2:1:1,5. Nas culturas alimentadas com glucose (GLIII-AL) a relação glucose: manose no EPS foi de 7:1, entretanto a relação manose, galactose arabinose manteve-se em aproximadamente 2:1:1,5. Isto sugere a presença de dois tipos de moléculas: um polímero composto apenas por unidades de glucose, e outro polímero composto por manose, galactose e arabinose. Entretanto, estudos mais aprofundados deverão ser realizados para se determinar que tipos de moléculas estão presentes nestes exopolissacarídeos.

A amostra GLII-SL foi submetida à análise de RMN de ^{13}C e o espectro obtido está mostrado na figura 20. Neste espectro é possível identificar grupos de sinais gerados pelos tipos de ligações listados na tabela 5. Os resultados de RMN de ^{13}C e a análise da composição monossacarídica desta fração sugerem fortemente que esta seja uma β -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3). A presença dos sinais em δ 86,1 e 86,3 sugerem substituição *O*-glicosídica por unidades de Glcp em β configuração como parte integrante da cadeia principal, a presença de sinais em δ 66,3 e 68,9 sugerem que esta cadeia principal apresenta-se ramificada em seu carbono 6 por unidades de β -D-Glcp. Porém estes dados devem ser confirmados pela análise de metilação.

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AMOSTRA DE EPS GLII-SL

Espectro de RMN- ^{13}C do EPS GLII-SL em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 70°C , com os deslocamentos químicos expressos em p.p.m.

TABELA 5 - PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO MOSTRADO NA FIGURA 20

Região dos sinais (ppm)	Tipo de ligação responsável pelos sinais
102,946	Ligação tipo β de carbono 1
86,098 – 86,312	Ligação tipo β de carbono 3
66,356 – 68,999	Ligação tipo β de carbono 6
60,712 – 60,971	Carbono 6 livre

5.3.2 Análise dos Açúcares do Meio de Cultura

Na tabela 6 estão apresentados os resultados das análises dos açúcares presentes em uma solução de peptona e extrato de levedura de concentração igual a usada no meio de cultura. Na amostra PEL-HT (solução de peptona e extrato de levedura submetida à hidrólise total) pode-se identificar os monossacarídeos que estão presentes no meio na forma livre e na forma de di, tri e oligossacarídeos. Na amostra

PEL-ML (solução peptona e extrato de levedura sem hidrólise total) os açúcares apresentados são os que se encontram apenas na forma de monossacarídeos. Nota-se que apenas uma pequena quantidade de açúcares se encontra no meio na forma de monossacarídeos. A concentração destes açúcares é muito pequena, sendo a glucose o que está em maior concentração (11,52 mg/L). Outro ponto importante que pode ser notado é que com a hidrólise total a quantidade de glucose identificada na amostra aumentou significativamente. Isto mostra que este açúcar é o principal componente monomérico de di, tri e oligossacarídeos presentes na peptona e no extrato de levedura.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES EM UMA SOLUÇÃO DE PEPTONA E EXTRATO DE LEVEDURA

Açúcar	Amostra PEL-ML		Amostra PEL-HT	
	Proporção (%)	Concentração no meio (mg/L)	Proporção (%)	Concentração no meio (mg/L)
Glucose	26,9	11,5	76,3	322,1
Galactose	20,4	9,4	4,9	20,2
Manose	19,5	9,0	7,2	30,6
Xilose	9,4	4,3	2,3	9,8
Arabinose	-	-	8,0	33,8
Inositol*	23,8	11,0	1,3	5,6

A concentração da solução de peptona e extrato de levedura utilizada como amostra estava na mesma concentração utilizada no meio de cultura

*O inositol apesar de não ser açúcar foi incluído nesta tabela

6 DISCUSSÃO

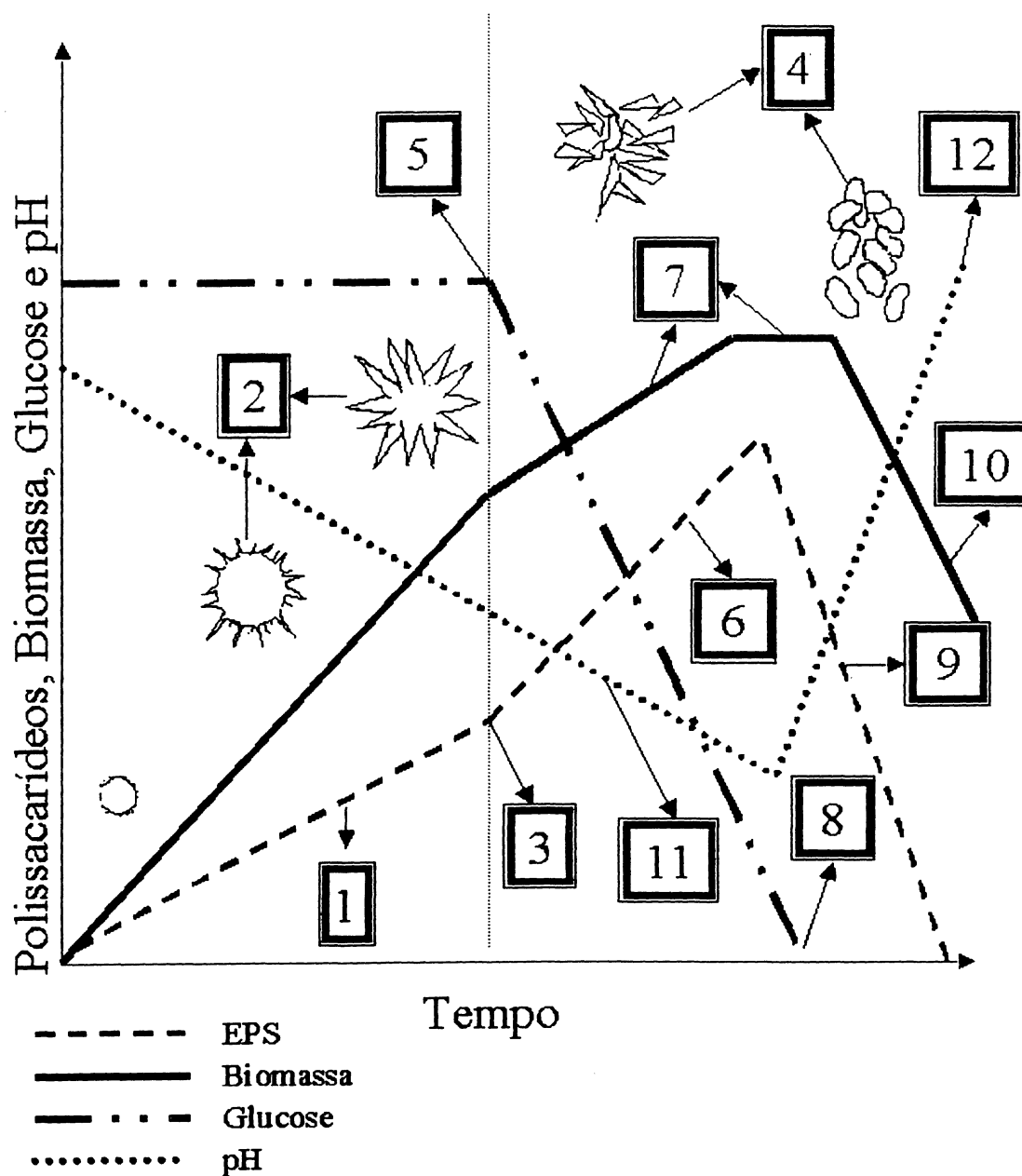
O objetivo principal deste capítulo é sugerir e discutir um modelo descritivo para os fenômenos observados. Este modelo está proposto na figura 21 e os pontos indicados estão resumidamente descritos abaixo. Uma discussão mais aprofundada, interligando os resultados obtidos e alguns dados da literatura será apresentada na seqüência.

Itens indicados na figura 21:

- 1) A produção de EPS aumenta lentamente com o tempo. Uma parte do EPS é liberada para o meio e outra permanece na estrutura do *pellet*, dificultando a difusão do oxigênio para as regiões internas.
- 2) A escassez de oxigênio no interior do *pellet* faz com que o crescimento de hifas ocorra preferencialmente na superfície na forma de protuberâncias.
- 3) Quando a produção de EPS atinge um determinado ponto, a concentração de oxigênio é tão pequena que ocorre autólise do centro dos *pellets*, comprometendo a sua estrutura.
- 4) Com isso ocorre a desagregação dos *pellets* de primeira geração e as protuberâncias liberadas passam a ser chamadas de *pellets* de segunda geração.
- 5) Somente a partir deste momento o fungo apresenta-se fisiologicamente apto para consumir a glucose do meio. Até este momento a glucose tinha um importante papel de induzir o crescimento a partir do consumo de outros substratos.
- 6) Ao consumir glucose a velocidade de produção de EPS passa a ser maior.
- 7) Por outro lado a velocidade de produção de biomassa diminui até atingir uma fase estacionária.
- 8) O consumo total da glucose marca uma nova fase.
- 9) Os EPS passam a ser consumidos na ausência de glucose.
- 10) A biomassa entra em uma fase de declínio por falta de nutrientes e autólise das células.
- 11) O metabolismo acidogênico ocorre na presença de glucose, sendo esta consumida ou não.

- 12) Na ausência de glucose ocorre metabolismo alcalinogênico apenas no final do cultivo.

FIGURA 21 – MODELO DESCRITIVO GERAL DOS FENÔMENOS OBSERVADOS DURANTE O CULTIVO SUBMERSO DE *G. lucidum*



6.1 DESAGREGAÇÃO DOS *PELLETS*

G. lucidum cresceu principalmente na forma de *pellets* (figura 5), que são densos agregados de hifas, normalmente esféricos (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). A principal vantagem, para quem cultiva um fungo, é a menor viscosidade que a forma de *pellets* proporciona ao sistema em comparação à morfologia na forma de hifas livres.

A forma de crescimento pode ter consequências para a produtividade de produtos. Para muitos compostos a morfologia na forma de *pellet* não é a que apresenta maior produtividade, pois somente a região externa é metabolicamente ativa (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Isto se deve a formação de um gradiente de disponibilidade de nutrientes e oxigênio da superfície para o interior do *pellet*. As células da superfície têm um amplo acesso ao oxigênio e aos nutrientes, enquanto que, para as células que estão em uma região interna, o acesso é reduzido gradativamente até zero devido às limitações no processo de difusão através do *pellet* (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). CARLSEN et al. (1995) mostraram em seus experimentos com *pellets* de *Aspergillus oryzae* que, exceto para uma concentração muito baixa de glucose no meio, o oxigênio era sempre o composto limitante no centro do *pellet*. O aumento de biomassa nas partes externas do *pellet* dificulta cada vez mais o acesso ao oxigênio às partes internas e quando a concentração de oxigênio chega a zero no centro do *pellet*, diz-se que este atingiu o raio crítico para a difusão de oxigênio. Uma região central oca é normalmente observada, devido a autólise das células nos *pellet* com raio maior que o raio crítico para a difusão de oxigênio (CLARK, 1962).

No presente trabalho os *pellets* de *G. lucidum* apresentaram um centro oco, o que indica que houve autólise no interior destes *pellets*. FANG e ZHONG determinaram o diâmetro crítico para um *pellet* de *G. lucidum*, sendo de 1,0 mm para a difusão do oxigênio (FANG; ZHONG, 2002c) e 10,0 mm para a difusão da glucose (FANG; ZHONG, 2002a). Somente no estágio II os *pellets* apresentaram um diâmetro maior que 10,0 mm. Desta forma a autólise no centro dos *pellets* aconteceu devido a

limitação de oxigênio pois, *pellets* com centros ocos foram observados tanto no estágio II como no estágio III.

A autólise no centro dos *pellets* causa uma desestabilização na sua estrutura, podendo o *pellet* se desmanchar completamente quando as forças que mantêm a sua estrutura se tornam menores que as forças hidrodinâmicas proporcionadas pela agitação do meio (NIELSEN, 1996). Desta forma, sugere-se que a desagregação dos *pellets* observados após 13-15 dias de cultivo no estágio II e após 10 dias no estágio III teve como causa principal a autólise das células do centro dos *pellets* que estavam sob condições de escassez de oxigênio.

6.2 INFLUÊNCIA DOS EPS NA DESAGREGAÇÃO DOS *PELLETS*

FANG e ZHONG (2002c) atribuíram o aumento do número de *pellets*, durante o cultivo submerso de *G. lucidum*, a uma possível desagregação dos *pellets*-mãe após estes alcançarem um tamanho limite. Estes autores não mostraram imagens nem mesmo forneceram maiores detalhes sobre a morfologia e a forma com que a desagregação teria acontecido.

Nenhum outro trabalho com *G. lucidum* em cultivo submerso descreve a presença de protuberâncias na superfície dos *pellets*, nem a forma com que a desagregação dos *pellets* acontece.

Para compreender como os polissacarídeos podem interferir na morfologia dos *pellets*, deve-se compreender que exopolissacarídeo é uma fração de polissacarídeos que é liberada para o meio de cultivo. Uma das características que pode distinguir os exopolissacarídeos dos polissacarídeos da parede celular é o seu grau de liberdade. Entretanto, uma parte dos exopolissacarídeos pode permanecer adsorvida à parede celular. Em uma estrutura compacta como os *pellets*, espera-se que uma quantidade de EPS permaneça retida no seu interior, sendo medida juntamente com a biomassa. Os principais fatores que contribuem para uma maior adsorção de EPS no interior dos *pellets* são:

- a) uma menor ação das forças de cisalhamento sobre os EPS produzidos pelas hifas internas do *pellet*. A atuação destas forças promoveria a liberação dos exopolissacarídeos adsorvidos à parede celular (YANG; LIAU, 1998b);
- b) a dificuldade de difusão de moléculas grandes, como os EPS, para a superfície do *pellet* onde acontece a liberação para o meio.

Desta forma considera-se que exista um processo relativamente lento de liberação de EPS do *pellet* para o meio.

A produção de EPS pode ser a responsável pelas alterações morfológicas observadas. Com base nos resultados do cultivo realizado sem glucose formulou-se a hipótese de que a presença de grandes quantidades de EPS intrapellet poderia dificultar a difusão do oxigênio para o interior dos *pellets*, resultando na autólise das hifas centrais e a desagregação dos *pellets*.

Esta hipótese seria suportada pelo fato de os *pellets* não se desmancharem nas culturas no estágio II, quando a glucose estava ausente desde o princípio (G0-0) (figura 12.). Isto pode ter ocorrido porque, como visto na figura 11c, as culturas G0-0 apresentaram uma pequena produção de EPS-extrapellet no início do cultivo e após 13 dias esta produção não foi mais detectada. Por outro lado, as culturas com glucose produziram uma quantidade crescente de EPS-extrapellet. Ao se assumir que uma alta concentração de EPS extrapellet indica uma condição de saturação de EPS no interior dos *pellet*, seria possível afirmar que os *pellets* das culturas G0-0 tinham uma baixíssima quantidade deste EPS-intrapellet na sua estrutura já que a partir do 13º dia não foi mais encontrado EPS no meio de cultivo.

A pequena quantidade de polissacarídeos produzidos na ausência de glucose pode ter proporcionado a estes *pellets* uma estrutura mais porosa, facilitando, desta forma, a difusão do oxigênio e permitindo que este atingisse as regiões centrais do *pellet*. Com isso, as células destas regiões não teriam sofrido autólise e por isso a estrutura do *pellet* foi mantida. A profundidade de penetração do oxigênio depende da sua taxa de consumo e da densidade do *pellet* (CUI et al., 1998). Quanto maior a porosidade do *pellet*, maior o coeficiente de difusão das substâncias e portanto maior a distância que o oxigênio pode alcançar em direção ao centro do *pellet* (CARLSEN et

al., 1995). Não se observou o centro dos *pellets* de *G. lucidum* cultivados sem glucose. Portanto não é possível dizer se estes *pellets* eram ocos ou não. Futuramente será interessante analisar se o oxigênio difunde até a região central destes *pellets* e se a sua desagregação não acontece pois não ocorre autólise no seu centro.

Após a adição de glucose às culturas mantidas até o 17º dia na ausência deste açúcar, observou-se um grande aumento na biomassa, um pequeno aumento na produção de EPS e na desagregação total dos *pellets*. Isto concorda com a hipótese de que os EPS são os responsáveis por causar a desagregação dos *pellets*. A produção de EPS voltou a acontecer na presença de glucose. A fração de EPS que permaneceu retida nos *pellets* pode ter contribuído para o aumento da sua densidade dificultando assim a difusão do oxigênio. O resultado seria a autólise da região central do *pellet* e isto seria o responsável pela desagregação observado 8 dias após a alimentação.

6.3 FORMAÇÃO DE PROTUBERÂNCIAS

A desagregação dos *pellets* é antecedida pela formação de protuberâncias na sua superfície. Estas protuberâncias foram notadas desde as fases iniciais de formação dos *pellets*, sendo originadas de hifas mais longas que se projetavam da superfície do *pellet* para o meio externo. Isto pode acontecer como uma forma de hifas especializadas escaparem da estrutura compacta do *pellet*, onde o oxigênio é limitado pela difusão.

Quando estes *pellets* cresciam com glucose desde o início, as protuberâncias aumentavam de tamanho até serem liberadas no processo de desagregação dos *pellets*. Nas culturas em que a glucose estava ausente desde o princípio, estas protuberâncias começaram a surgir como nas culturas com glucose, visto que o perfil das culturas com e sem glucose foi idêntico até o 9º dia. Entretanto, as protuberâncias não aumentaram de tamanho a partir do 9º dia, apesar de haver aumento de biomassa total até o 21º dia. A parada do crescimento das protuberâncias acontece de forma simultânea à redução da produção de EPS. Desta forma, sugere-se que o consumo dos polissacarídeos acarretou em um aumento da porosidade dos *pellets*. O crescimento de

hifas especializadas que se lançavam para fora do *pellet* em busca de regiões mais oxigenadas passou a ser desnecessário. Quando a glucose foi adicionada à estas culturas, a biomassa voltou a produzir EPS (figura 11c). A presença destas moléculas retidas na estrutura do *pellet* limitaria a difusão do oxigênio sendo necessário o crescimento na forma de protuberâncias até o momento da desagregação dos *pellets*.

6.4 CONSUMO DE GLUCOSE

A glucose não é um substrato de primeira escolha para *G. lucidum* quando peptona e extrato de levedura estão presentes. O motivo pelo qual isto acontece não é claro, mas devido à grande concentração de biomassa obtida antes do início do consumo da glucose e o fato de o meio não possuir quantidades significativas de outros mono, di, tri ou oligossacarídeos (tabela 6) leva a crer que *G. lucidum* prefere consumir substratos mais complexos como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Na literatura, em apenas um trabalho com *G. lucidum* identificou-se um comportamento semelhante ao apresentado nesta dissertação (TANG; ZHONG, 2003). Apesar de os autores não comentarem nada a respeito de crescimento sem o consumo da fonte de açúcar (lactose no caso) é possível identificar nos gráficos de crescimento e consumo de açúcar apresentados por eles, que houve a produção de aproximadamente 3,3 g/L de biomassa sem consumo significativo de lactose durante os primeiros dois dias de cultivo. Este experimento foi realizado em biorreator com um meio de cultura composto por lactose 35 g/L, peptona 5 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L e demais sais.

O não consumo da glucose nos primeiros dias de cultivo no estágio II poderia ser explicado devido a uma necessidade do fungo se adaptar a presença deste açúcar, sendo necessário um período longo para a indução de enzimas necessárias para o metabolismo deste açúcar. Entretanto, esta explicação talvez não seja a mais apropriada, pois antes de ser inoculado nas culturas do estágio II, este fungo cresceu por 8 dias em um meio sólido rico em glucose (CBD no estágio I) e este açúcar ainda estava presente quando estas culturas foram utilizadas para o inóculo do estágio II (ver

seção 5.1.4). Desta forma, especula-se que o consumo da glucose não aconteceria nas fases iniciais do estágio II devido a uma alteração morfológica e fisiológica causada pela mudança do meio sólido para o meio líquido. Entretanto, ainda é cedo para se propor um mecanismo pelo qual isto aconteceria.

Outros dois resultados contribuem para a proposta de que o consumo de glucose e morfologia do micélio estão interligados. O primeiro resultado foi a observação de que o consumo de glucose sempre aconteceu após a desagregação dos *pellets*. Ou seja, *pellets* de primeira geração não estariam aptos para consumir glucose, mas os *pellets* de segunda geração sim. O segundo resultado foi o perfil de consumo de glucose no estágio III. Neste estágio houve consumo de glucose desde o início porque o inóculo era constituído basicamente por *pellets* de segunda geração do estágio II. Apesar de haver consumo desde o início, este consumo aconteceu de forma mais lenta. Uma explicação para isto seria a de que no inóculo também havia *pellets* de primeira geração que ainda não haviam se desmanchado completamente e estes *pellets* não consumiam glucose. Desta forma uma parte da biomassa crescia consumindo mais glucose do que peptona e extrato de levedura e outra parte crescia consumindo somente peptona e extrato de levedura. Outra explicação seria a de que o fungo inicialmente preferiu consumir outros substratos em detrimento da glucose, entretanto se isto fosse o único motivo a alimentação de peptona e extrato de levedura feita no estágio II deveria resultar em uma desaceleração do consumo da glucose, mas o observado foi o oposto (Figura 9a).

6.5 EFEITO INDUTOR DA GLUCOSE

O mais interessante é que a glucose, apesar de não ser consumida nas fases iniciais do estágio II, age como se fosse um indutor de crescimento. Se ela está presente o fungo cresce consumindo outros substratos com um rendimento na ordem de 0,6 a 0,8 g-biomassa/g-peptona e extrato de levedura, considerando que uma grande proporção destes substratos tenha sido consumida até este momento, apesar de a concentração destes substratos não ter sido monitorada. Este rendimento não é

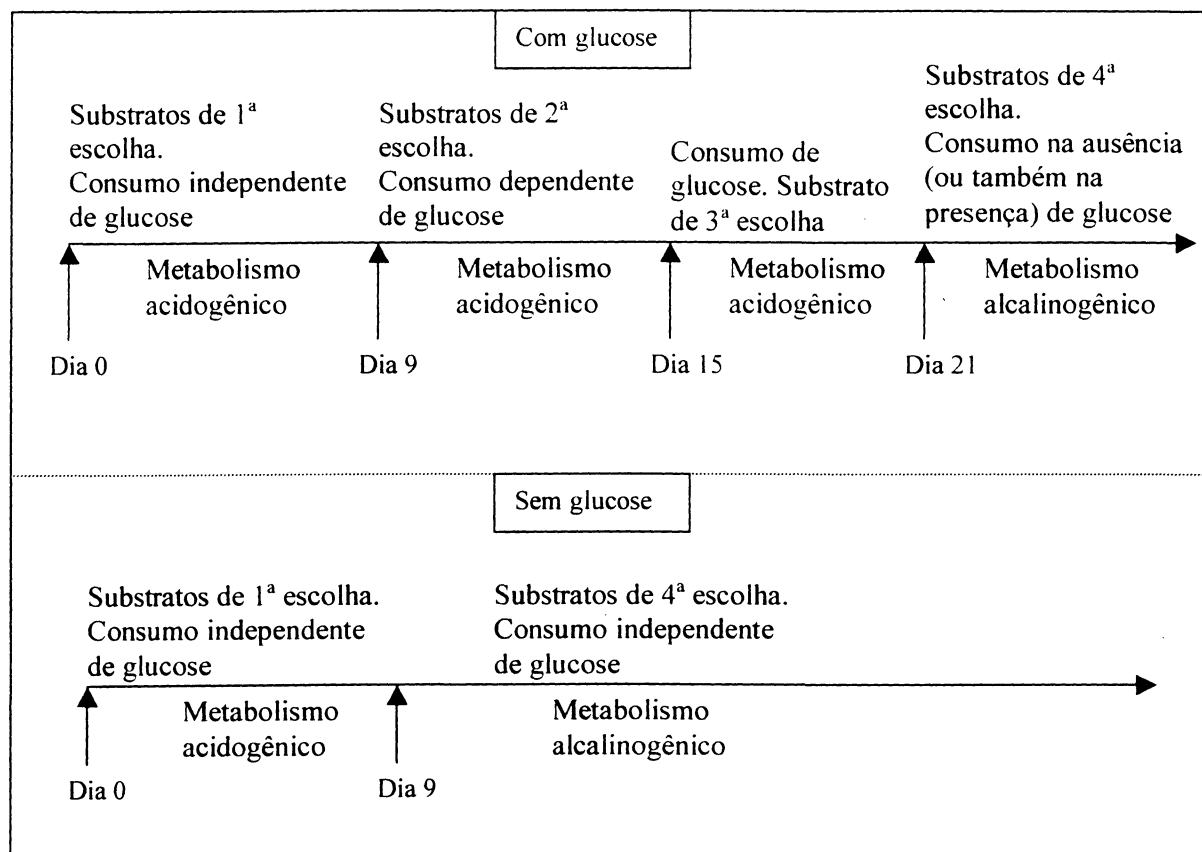
surpreendente porque o rendimento pode ser maior do que o valor típico de 0,4 a 0,6 g/g para o crescimento com glucose (SHULER; KARGI, 1992), desde que o substrato seja mais reduzido do que este açúcar. Este seria o caso com extrato de levedura e peptona.

Se a glucose não está presente, o fungo cresce, mas com um rendimento muito menor. Na figura 22 propõe-se um esquema para demonstrar o consumo de diferentes substratos ao longo do cultivo. Até o 9º dia as culturas com e sem glucose se desenvolvem da mesma forma. Sugere-se que até este ponto o fungo consome substratos de “primeira escolha” e o seu consumo é independente da presença da glucose. Esta fase é caracterizada por uma queda no pH em ambas as culturas. A partir do 9º dia nota-se uma diferença no comportamento entre as culturas, pois somente se a glucose está presente o fungo cresce bastante consumindo os “substratos de segunda escolha” diferentes da glucose. O consumo destes substratos faz com que o pH continue diminuindo. Se a glucose não está presente o crescimento é muito pequeno pois os substratos de segunda escolha não seriam consumidos. Neste caso o que acontece é o consumo de um outro tipo de substrato que será chamado de substrato de “quarta escolha”. Estes substratos de “quarta escolha” seriam responsáveis pelo aumento do pH. A glucose seria o substrato de “terceira escolha” e o seu consumo mantém o pH baixo.

Os substratos de “quarta escolha” podem estar sendo consumidos de forma simultânea à glucose e até mesmo aos substratos de “primeira e segunda escolha” entretanto, o seu consumo, através do aumento do pH só é notado após a exaustão da glucose. Isto pode acontecer porque o(s) ácido(s) orgânico(s) produzido(s) como produto(s) secundário(s) do metabolismo da glucose (e dos substratos de “primeira e segunda escolha”) neutralizariam os produtos secundários alcalinogênicos gerados pelo consumo dos substratos de “quarta escolha”. Outra possibilidade é que os substratos de “quarta escolha” sejam iguais aos demais substratos e o que difere é a via pela qual estes são metabolizados. Na presença de glucose esta via seria acidogênica (com produção de ácidos orgânicos) e na ausência de glucose alcalinogênica (com deaminação de proteínas e aminoácidos).

Apesar de se propor uma explicação para a queda do pH, a forma com que isto acontece ainda não está clara uma vez que as análises por CLAE não mostraram a produção de quantidades significativas de ácidos orgânicos.

FIGURA 22 – ESQUEMA DA PROPOSTA DE CONSUMO DE DIFERENTES SUBSTRATOS AO LONGO DO CULTIVO



Este efeito indutor da glucose pode ser visualizado na figura 11a. Quando a glucose foi introduzida, nas culturas em que ela não estava presente até o 17º dia, observou-se, até o 21º dia, um grande aumento de biomassa e uma queda acentuada do pH. Entretanto, a concentração de glucose quase não diminuiu nestas culturas durante este intervalo. Isto mostra que determinados substratos só puderam ser consumidos quando a glucose estava presente.

6.6 RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA, CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE EPS

Em todos os experimentos realizados no estágio II, o aumento da produção de EPS ocorreu sempre de forma simultânea a desagregação dos *pellets* e ao início do consumo de glucose (figuras 8a, 9c e 11c). Ainda não se pode afirmar quais destes três fatores são as causas e quais são as conseqüências mas a partir dos resultados obtidos sugere-se a hipótese apresentada no próximo parágrafo.

A produção de EPS aconteceria nos *pellets* de primeira geração a partir de substratos que não a glucose. O acúmulo de EPS-intrapellet causaria as alterações morfológicas como discutido na seção 6.2. A partir do momento que a morfologia está na forma de *pellets* de segunda geração, o consumo de glucose se tornaria possível e a partir deste substrato a produção de EPS seria maior do que aquela que acontece nos *pellets* de primeira geração.

Esta hipótese concorda com o resultado de dois experimentos distintos. O primeiro foi a alimentação de peptona e extrato de levedura nas culturas no estágio II. Neste caso a desagregação prematura dos *pellets* de primeira geração, observado após a alimentação, possibilitou o consumo de glucose pelos *pellets* de segunda geração. Ao consumir glucose, a velocidade de produção de EPS foi maior. O segundo experimento foi o cultivo no estágio III. O perfil de produção de EPS neste estágio acompanha o perfil de consumo de glucose e não o de produção de biomassa (figuras 15c e 17b).

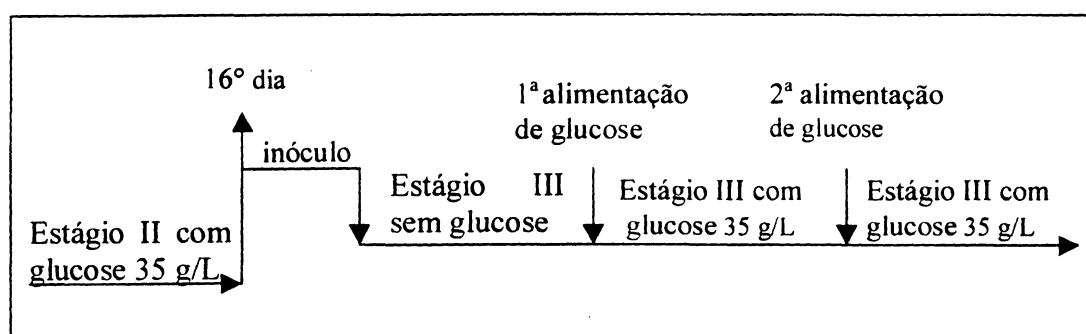
6.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS

O estágio III é muito mais eficiente que o estágio II em termos de concentração máxima de EPS produzida. A quantidade máxima de EPS produzida em um cultivo nas condições padrão, sem alimentação, no estágio III, foi de $3,3 \pm 0,8$ g/L no 7º dia de cultivo, 4 vezes maior que no estágio II, quando se obteve, em condições padrão (35 g/L de glucose no início) $0,8 \pm 0,2$ g/L de EPS como valor máximo alcançado no 17º dia de cultivo.

A produção máxima de EPS ocorreu no estágio III quando uma quantidade adicional de glucose foi introduzida no meio após 10 dias de cultivo. Neste caso obteve-se $5,7 \pm 0,4$ g/L de EPS e este valor corresponde a 3,3 vezes o rendimento máximo confiável de EPS reportado na literatura para esta espécie (YANG; LIAU, 1998b). Valores maiores de EPS foram reportados na literatura (tabela 1), mas como a metodologia de quantificação utilizada nestes trabalhos baseou-se apenas na secagem por calor e gravimetria, estes resultados não foram considerados para comparação.

Durante o estágio II, a adição de 35 g/L de glucose no 17º dia às culturas que estavam sendo cultivadas sem este açúcar proporcionou uma produção máxima de EPS de $1,3 \pm 0,3$ g/L, 72 % maior do que as culturas cultivadas com a mesma quantidade de glucose desde o início. Isto mostra que uma menor quantidade de biomassa formada na ausência de glucose produz mais EPS, ao entrar em contato com a glucose, do que a grande quantidade de biomassa formada na presença de glucose desde o início do cultivo. Esta estratégia de cultivo poderia ser aplicada no estágio III com o intuito de se obter um rendimento de EPS ainda maior que o já obtido neste estágio. A proposta para este experimento está esquematizada na figura 23. Inocularia-se o estágio III sem a presença de glucose e após o desenvolvimento da biomassa introduziria-se a glucose. Quando esta glucose fosse exaurida, faria-se uma segunda alimentação de glucose a fim de aumentar ainda mais a produção de EPS.

FIGURA 23 - ESQUEMA DE UMA PROPOSTA DE EXPERIMENTO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EPS



6.8 INÓCULO

A mudança das condições de cultivo foi muito grande entre os estágios I e II. Já entre os estágios II e III a mudança foi relativamente pequena e a formação de biomassa ocorreu de forma linear desde o início do estágio III. A ausência de fase de adaptação (lag) no início do processo mostra a importância de as condições de cultivo do inóculo serem semelhantes às condições de cultivo do processo principal. O aumento da concentração do inóculo do estágio III serviu para mostrar que na faixa de concentração de inóculo testada, a velocidade de crescimento não depende fortemente da quantidade inicial de biomassa no sistema.

Na maioria das vezes, as informações da literatura não são claras o suficiente para se reproduzir a forma de inóculo empregada nos diversos trabalhos (tabela 1). Em alguns casos, os autores citam a utilização de frações de pré-culturas líquidas como inóculo, entretanto a reprodutibilidade destes inóculos é questionável. Como seria possível inocular vários frascos de forma simultânea e esperar que todos os frascos recebam quantias iguais de biomassa se esta se encontra na forma de *pellets*? A heterogeneidade de uma cultura na forma de *pellets* de primeira geração é muito grande, sendo difícil separar frações de mesmo volume contendo a mesma quantidade de biomassa. Alguns autores trituram o micélio, o que permite a retirada de frações mais homogêneas. Apesar de este procedimento facilitar a reprodutibilidade entre os vários frascos inoculados, os danos no micélio causados pela trituração podem interferir no desenvolvimento das novas culturas inoculadas. Neste trabalho mostrou-se que é possível inocular diversas culturas com quantidades essencialmente iguais de biomassa, ao se utilizar como inóculo uma pré-cultura (estágio II) após o fenômeno de desagregação dos *pellets* de primeira geração. Neste caso, a trituração da biomassa se torna desnecessária pois a homogeneidade da cultura com *pellets* de segunda geração é bastante grande.

6.9 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Bactérias e leveduras crescem normalmente seguindo uma cinética exponencial, quando todos os nutrientes estão livremente disponíveis. Neste caso, a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de biomassa viável. Ou seja, quanto mais biomassa há no sistema, mais rapidamente uma quantidade nova de biomassa é produzida a partir da biomassa inicial. Para o crescimento de fungos filamentosos dificilmente se esperaria um crescimento exponencial porque a forma de crescimento não é como nas bactérias e leveduras em que cada célula se divide gerando duas células. Neste trabalho, como na maioria dos trabalhos na literatura (ver tabela 1), a cinética de crescimento de *G. lucidum* apresentou um caráter linear. Neste caso, a velocidade de crescimento não depende da biomassa total, mas provavelmente depende de algum componente importante para o crescimento que é fornecido de forma constante. O oxigênio, devido às limitações de difusão do meio gasoso para o líquido poderia ser sugerido como componente que limita o crescimento a uma cinética linear. Entretanto, TANG e ZHONG (2003) realizaram experimentos em biorreator mantendo a tensão de oxigênio dissolvido em 25% de saturação durante todo o tempo de cultivo. Mesmo assim a cinética de crescimento foi linear.

Quando o crescimento acontece somente na forma de *pellets* esféricos a cinética muitas vezes segue a lei da raiz cúbica (ver equação 1 na seção 5.1.1). Isto se deve ao fato de o crescimento ocorrer somente nas regiões externas dos *pellets* quando o raio destes ultrapassa o raio crítico para a difusão de oxigênio e nutrientes. (NIELSEN, 1996). Neste trabalho o crescimento dos *pellets* da fração G até o momento da sua desagregação se ajustou bem a cinética da raiz cúbica. Entretanto, a biomassa total não estava somente na forma de *pellets* esféricos. Uma fração consideravelmente grande de biomassa cresceu como micélio aderido à parede do frasco. Além disso após a desagregação dos *pellets*, estes não apresentaram mais o formato esférico. Poderia a soma de todos estes fatores ter resultado em uma cinética com caráter linear? Esta é uma pergunta que ainda permanece sem resposta.

6.10 CRESCIMENTO ADERIDO À PAREDE DO FRASCO

Durante os estágios II e III uma grande quantidade de biomassa cresceu aderida à parede interna dos frascos de erlenmeyer. Em nenhum dos trabalhos anteriores com *G. lucidum* este fato foi reportado. Mesmo nos trabalhos em que os autores realizaram o fracionamento da biomassa, de acordo com o diâmetro dos *pellets*, esta fração aderida não foi reportada. Desta forma questiona-se se estes autores simplesmente desconsideraram esta fração de biomassa, se a incluíram na fração de maior tamanho (fração G) ou se esta fração não existiu. Acredita-se que o crescimento de uma parte da biomassa de forma aderida à parede do frasco não seja uma característica exclusiva da cepa utilizada no presente trabalho, mas sim uma característica da espécie. Esta sugestão é baseada no trabalho de YANG, KE e KUO (2000) que introduziram esponjas de poliuretano no meio líquido e observaram que todo o micélio cresceu aderido a este suporte. Na natureza, este fungo cresce sobre madeira e isto pode explicar a afinidade que demonstra para o crescimento sobre suportes sólidos durante o cultivo submerso. Esta característica pode causar problemas durante o cultivo em biorreatores, pois o crescimento sobre agitadores e sensores imersos no meio pode prejudicar os controles do processo. Por outro lado, YANG, KE e KUO (2000) sugeriram que o uso de suportes sólidos inertes imersos no meio poderia proporcionar uma forma de recuperação da biomassa e do EPS produzido.

A produção de EPS na fração aderida parece ter a finalidade de proporcionar a adesão do micélio ao suporte. Nos experimentos realizados, notou-se que na biomassa aderida, a face que ficava em contato com a parede do frasco era coberta por uma substância gelatinosa e que se constatou, através da reação do fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956), ser rica em carboidratos, provavelmente EPS. Quando o fungo foi cultivado sem glucose e a produção de EPS foi reduzida a zero, esta fração perdeu a capacidade de se manter aderida à parede do frasco e a sua rigidez era também muito inferior ao normal.

6.11 ANÁLISES PRELIMINARES DE EPS

As análises preliminares dos exopolissacarídeos produzidos por *Ganoderma lucidum* neste trabalho indicaram que esta fração de polissacarídeos deve ser constituída principalmente por uma mistura de β -glucanas. Entretanto, polissacarídeos contendo outros açúcares diferentes da glucose também estão presentes nesta fração. Isto já havia sido mostrado por SONE et al. (1985), que analisou a composição monossacarídica dos exopolissacarídeos produzidos em meio submerso. Este autor mostrou que a proporção de glucose, manose e galactose na fração exopolissacarídica variou dependendo do tipo de açúcar utilizado como principal fonte de carbono no meio de cultura, entretanto a glucose foi sempre o monossacarídeo predominante na fração EPS.

MIZUNO et al. (1995) relatam que os exopolissacarídeos produzidos por *Ganoderma lucidum*, após secos e separados em frações insolúveis (47%) e solúveis em água (53%), apresentaram composição distinta. A fração insolúvel era constituída por β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanas e apresentou alta atividade antitumoral. Já a fração solúvel era constituída por heteroglucanas compostas por glucose, manose e galactose (razão molar de 1,0:0,5:0,13) e esta fração não apresentou atividade antitumoral.

Os dados de MIZUNO et al. (1995), quanto à constituição dos EPS e a sua solubilidade, podem explicar porque neste trabalho a composição monossacarídica diferiu nas amostras de EPS obtidas a partir do filtrado do meio de cultivo sem lavagem do micélio (GLII-SL) e com lavagem do micélio (GLII-NR). O fato de haver uma maior proporção de glucose quando o micélio foi lavado pode ter sido resultado de uma maior liberação das β -glucanas (fração insolúvel) adsorvidas à parede celular das hifas dentro do *pellet*.

O fato de o fungo ter produzido um EPS constituído somente por glucose (GLII-AL) quando entrou em contato com este açúcar após 17 dias de cultivo na sua ausência, aponta uma nova estratégia que poderá ser explorada para a produção de β -glucanas, principais responsáveis pela atividade biológica dos EPS de *G. lucidum* (MIZUNO et al., 1995). Estratégias de cultivo e de extração que aumentem a

proporção de β -glucanas em relação aos demais polissacarídeos poderão no futuro ser de grande interesse para a produção comercial destas moléculas.

6.12 PONTOS QUE DEVEM SER INVESTIGADOS E PROPOSTAS DE EXPERIMENTOS

O objetivo desta seção é mostrar, de forma resumida, quais as principais dúvidas geradas a partir deste trabalho. Para cada ponto sugere-se uma estratégia de investigação.

a) *A desagregação dos pellets ocorre em resposta à autólise no seu centro?* Esta questão poderá ser resolvida com análise microscópica do micélio que constitui as diferentes regiões do *pellet*. Sugere-se o uso da microscopia confocal e o uso de corantes que se tornam fluorescentes ao serem metabolizados por células vivas (ex. diacetato de fluoresceína) como ferramenta para a análise da viabilidade do micélio em diferentes profundidades do *pellet*.

b) *A autólise ocorre em resposta a uma limitação de oxigênio como mostra a literatura?* Sugere-se o uso de microsondas de oxigênio que permitam a determinação da concentração deste substrato no interior dos *pellets* (WITTLER et al., 1986).

c) *Ocorre autólise no centro dos pellets das culturas sem glucose (G0-0)?* Em primeiro lugar pode-se verificar se o centro destes *pellets* também é oco como nos *pellets* que se formam nas culturas com glucose. Isto já seria um indicativo da autólise. Em segundo lugar poderão ser realizadas análises microscópicas como sugerido na alínea a.

d) *Os pellets formados na ausência de glucose possuem uma quantidade menor de polissacarídeos do que os pellets formados na presença de glucose?* Sugere-se a extração e quantificação dos polissacarídeos dos *pellets*.

e) *O efeito indutor da glucose ocorre devido à pressão osmótica?* Poderia-se substituir a glucose por um açúcar, ou poliálcool não metabolizável por este fungo e testar diferentes concentrações desta substância, verificando a resposta do fungo frente à diferentes pressões osmóticas.

f) *O efeito de indução no crescimento causado pela glucose depende da concentração deste açúcar?* Poderia-se variar a concentração inicial de glucose e também a concentração de glucose adicionada às culturas mantidas sem este açúcar durante os primeiros dias de cultivo. Outra possibilidade é variar a concentração inicial de peptona e extrato de levedura para verificar se o fenômeno de indução do crescimento também é alterado.

g) *O perfil de consumo da glucose seria semelhante com outros açúcares? Outros açúcares também agem como indutores do crescimento?* Sugere-se testar no estágio II outros açúcares simples como frutose, galactose, manose e até mesmo dissacarídeos como sacarose e lactose.

h) *O perfil de consumo da glucose seria mantido com a substituição da peptona e do extrato de levedura por outros substratos?* Sugere-se realizar um cultivo no estágio II com caldo batata, extrato de malte ou outra fonte complexa de carbono e nitrogênio. Até mesmo fontes definidas como misturas de aminoácidos poderiam ser testadas.

i) *Quais são os substratos de “primeira, segunda e quarta escolha” consumidos durante as diferentes fases do cultivo?* Para responder esta pergunta seria interessante realizar testes de cultivo substituindo a peptona e o extrato de levedura por substratos definidos e que pudessem ter a sua concentração monitorada ao longo do tempo.

j) *O meio de cultura do estágio I exerce influência sobre o perfil de consumo da glucose durante o estágio II?* Sugere-se substituir o meio sólido BDA pelo meio empregado no estágio II solidificado com ágar. Desta forma a adaptação do microrganismo ao mudar de estágio seria apenas morfológica e não nutricional.

k) *A idade dos pellets de segunda geração das culturas no estágio II inoculados nas culturas de estágio III afeta o perfil de crescimento, consumo de glucose e produção de EPS durante o estágio III?* Testar diferentes idades de pellets de segunda geração a partir da desagregação dos pellets de primeira geração no estágio II. Poderia-se inclusive fragmentar artificialmente os pellets de primeira geração e

utilizar esta biomassa como inóculo do estágio III a fim de testar a importância do estado morfológico no inóculo.

l) *A alimentação de glucose no estágio III poderia proporcionar um rendimento de EPS maior caso fosse realizada mais cedo?* Alimentar as culturas após diferentes tempos de cultivo.

m) *Poderia-se obter um rendimento de EPS maior no estágio III caso este fosse iniciado sem glucose?* Testar o experimento proposto na figura 23.

n) *A estrutura dos EPS varia ao longo do cultivo? Os EPS produzidos no estágio II possuem estrutura diferente daqueles produzidos no estágio III?* Para responder esta pergunta deve-se fazer uma análise estrutural de polissacarídeos mais aprofundada como por exemplo análises de metilação.

7 CONCLUSÃO

O conhecimento a respeito do comportamento de *G. lucidum* em cultivo submerso é ainda muito limitado e o entendimento das causas de muitos dos efeitos observados não é claro o suficiente para que estas possam ser manipuladas corretamente com o intuito de se otimizar o processo tanto na escala laboratorial como em uma escala maior. Esta dissertação traz várias contribuições para a área do cultivo de *G. lucidum* e a produção de seus exopolissacarídeos. Dentre estas contribuições as principais são:

- a) descrição do comportamento fisiológico e morfológico durante as primeiras fases do cultivo. Nenhum trabalho, até o momento, havia dado importância para a etapa de preparo do inóculo, entretanto verificou-se características peculiares do comportamento deste fungo durante esta fase e que não são facilmente percebidas nas fases posteriores;
- b) identificação de um efeito indutor da glucose sobre o crescimento;
- c) obtenção da maior concentração de EPS já descrita na literatura para esta espécie;
- d) proposição de um modelo descritivo dos eventos fisiológicos e morfológicos que ocorrem durante o cultivo. Formulação de hipóteses para explicar porque as alterações morfológicas acontecem e de que forma estão relacionadas com o consumo de substrato e a produção de EPS. Tanto o modelo como as hipóteses formuladas poderão ajudar a direcionar pesquisas futuras, pois na literatura sobre *Ganoderma lucidum* não há uma discussão mais ampla sobre fisiologia e morfologia, como a apresentada neste trabalho;
- e) sugestões de abordagens para pesquisas futuras que possibilitarão o esclarecimento de muitas das dúvidas sobre o comportamento deste fungo em cultivo submerso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

CARLSEN, M.; SPOHR, A. B.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Morphology and physiology of a α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 49, p. 266-276, 1995.

CLARK, D. S. Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide-treated beet molasses: morphology of pellets of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 133-136, 1962.

CUI, Y. Q.; OKKERSE, W. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 60, n. 2, p.216-219, 1998.

DAHLQVIST, A. Determination of maltose and isomaltose activities with a glucose oxidase reagent. **Biochemical Journal**, London, v. 80, p.547-551, 1961.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, Oxon, UK, v. 37, n. 7, p. 769-774, 2002a.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2002b.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 18, n. 1, p. 51-54, 2002c.

FANG, Q. H.; TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, Oxon,UK, v. 37, n.12, p. 1375-1379, 2002.

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

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M. The relevance of solid-state substrate moisturing on *Ganoderma lucidum* biomass cultivation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, Croatia, v. 38, n. 3, p. 225-228, 2000.

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B. Immunostimulatory effects of fungal polysaccharides from *Ganoderma lucidum* submerged biomass cultivation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, Croatia, v. 39, n. 4, p. 327-331, 2001.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology**, local, v. 37, p. 101-134, 1992.

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

LEE, K. M.; LEE, S. Y.; LEE, H. Y. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, Japan, v. 88, n. 6, p. 646-650, 1999.

MAYZUMI, F.; OKAMOTO, H.; MIZUNO, T. Cultivation of Reishi (*Ganoderma lucidum*). **Food Reviews International**, Monticello, USA, v.13, n. 3, p. 365-382, 1997.

MITCHELL, D. A. Biomass determination in solid state cultivation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLTZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p.53-63.

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

MIZUNO, T.; WANG, G. Y.; ZHANG, J.; KAWAGISHI, H.; NISHITOBA, T.; LI, J. X. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. **Food Reviews International**, Monticello, USA, v. 11, n. 1, p. 151-166, 1995.

MIZUSHINA, Y.; TAKAHASHI, N.; HANASHIMA, L.; KOSHINO, H.; ESUMI, Y.; UZAWA, J.; SUGAWARA, F.; SAKAGUCHI, K. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, Oxon, UK, v. 7, p. 2047-2052, 1999.

NEY, D M; LASEKAN, J B; KIM, J. Relative effects of dietary oleic- and linoleic-rich oils on plasma lipoprotein composition in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, USA, v. 119, n. 6, p. 857-863, 1989.

NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. **Trends in Biotechnology**, Linerick, Ireland, v. 14, 438-443, 1996.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. Engelwood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1992.

SONE, Y.; OKUDA, R.; WADA, N.; KISHIDA, E.; MISAKI, A. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma-lucidum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, Japan, v. 49, n. 9, p. 2641-2653, 1985.

STAMETS, P. **Growing gourmet & medicinal mushrooms**. Berkeley: Ten Speed Press, 1993.

SU, C. Y.; SHIAO, M. S.; WANG, C. T. Potentiation of ganodermic acid S on prostaglandin E-1-induced cyclic AMP elevation in human platelets. **Thrombosis. Research**, New York, v. 99, n. , p. 135-145, 2000.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Exopolysaccharides biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, Netherlands, v. 24, p.1023-1026. 2002a.

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

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 3-4, p. 478-484, 2003.

WITTLER, R.; BAUMGARTI, H.; LÜBBERS, D. W.; SHÜGERL, K. Investigation of oxygen transfer into *penicillium chrysogenyn pellets* by microprobe measurements . **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 28, p.1024-1036, 1986.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetilation Methods. **Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p.2211-215, 1963.

YANG, F. C.; KE, Y. F.; KUO, S. S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 3-5, p. 295-301, 2000.

YANG, F. C; LIAU, C. B. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. **Bioprocess Engineering**, Berlin, v.19, p. 233-236, 1998a.

YANG, F. C.; LIAU, C. B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry**, Oxon, UK, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998b.

ZHANG, J.; WANG, G.; LI, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H.; MAYUZUMI, H.; OKAMOTO, H.; LI, J. Antitumor active protein-containing glycans from the chinese mushroom songshan-lingzhi, *Ganoderma-tsugae* mycelium. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, Japan, v. 58, n. 7, p. 1202-1205, 1994.